

**Entwicklung eines photostabilen Cyaninfarbstoffs
für funktionelle DNA-Sonden sowie
DNA-modifizierte Upconversion-Nanopartikel**

Dissertation

zur Erlangung des

DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der naturwissenschaftlichen Fakultät IV – Chemie und Pharmazie
der Universität Regensburg



von

Diplom-Ingenieur (FH)

Moritz M. Rubner

aus Altisheim

Regensburg 2011

Diese Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht.

Promotionsgesuch eingereicht am: 24. November 2011

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Dezember 2011

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. Axel Jacobi von Wangelin (Vorsitzender)
Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht
Prof. Dr. Otto S. Wolfbeis
Prof. Dr. Joachim Wegener

Des is wia bei jeda Wissenschaft,
am Schluss stellt sich dann heraus,
dass alles ganz anders war.

Karl Valentin

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 2008 bis November 2011 am Institut für Organische Chemie der Universität Regensburg unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht angefertigt.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht. Er ermöglichte mir die Promotion in seinem Arbeitskreis und den Zugang zu dem spannenden Gebiet der DNA-Chemie. Ebenso danke ich ihm für die hervorragende Betreuung und Unterstützung sowie für die wissenschaftliche Freiheit, die ich während dieser Zeit erfuhr.

Im speziellen möchte ich mich bedanken bei:

- Herrn Prof. Dr. Wolfbeis für die Möglichkeit einer Kooperation mit Upconversion Nanopartikeln. In diesem Zusammenhang gilt mein besonderer Dank Daniela Achatz und Dr. Heike Mader für die Bereitstellung der Nanopartikel und der stets so hilfsbereiten Beantwortung aller meiner Fragen.
- Herrn Prof. Dr. Wegener für die Möglichkeit unsere Ideen an Zellen zu verwirklichen. In diesem Zusammenhang gilt mein besonderer Dank Dr. Judith Stolwijk und Michaela Sperber für die Zellkulturen und Cytotoxizitätstests.
- Herrn Prof. Dr. Gregory Harms für die Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop.
- Herrn Prof. Dr. Witzgall und Herrn Prof. Dr. Göpferich für die Möglichkeit die entwickelte Fluoreszenzsonde bioanalytisch einzusetzen. In diesem Zusammenhang besonders Sabrina Kracher, die sämtliche Zellexperimente durchführte und mir die dort entstandenen Aufnahmen zur Verfügung stellte.
- Heiko Sigmund vom Institut für Pathologie am Klinikum der Universität Regensburg sowie Herrn Dr. Schneider vom Laboratorium für Elektronenmikroskopie am KIT für die Anfertigung der TEM-Bilder.
- Dr. Thomas Burgemeister und seinen Mitarbeitern der NMR-Abteilung der Universität Regensburg für die Messung und Interpretation meiner Proben.
- Josef Kiermeier und Wolfgang Söllner für die Anfertigung und Interpretation der Massenspektren meiner Proben.

- Frau Weck und Frau Sommer für ihre stetige Hilfsbereitschaft und Unterstützung in organisatorischen und verwaltungstechnischen Belangen.
- Der Regensburger Chemiker-Bergsporttruppe (Wolfgang, Hias, Walter, Julian und Tom) für die herzliche Aufnahme und die schöne Zeit außerhalb des Labors.
- Meinen Kollegen: Dr. Janez Barbaric, Sebastian Barrois, Effi Bätzner, Dr. Sina Berndl, Dr. Christoph Beyer, Peggy Bohländer, Andreas Dittmer, Dr. Thomas Ehrenschwender, Nadine Herzig, Carolin Holzhauser für die Bereitstellung des Thiazolrot, Annette Hochgesand, Fabio Krohm, Daniel Lachmann, Michaela Lutz, Dr. Florian Menacher, Alexander Penner, Dr. Christa Prunkl, Wolfgang Schmucker, Nico Seeleib, Sabrina Sezi, Claudia Stubinitzky, Dr. Reji Varghese, Dr. Claudia Wanninger-Weiß, Michael Weinberger, Christian Wellner und Ulrike Wenge für die schöne Zeit im AK Wagenknecht.
- Meinen Laborkollegen Tom, Caro, Flo, Daniel, Christian und Gaudi Claudi, die mir nach drei schönen Jahren gute Freunde geworden sind.

Besonders möchte ich den beiden Menschen danken, ohne die weder diese Arbeit, noch vieles andere möglich geworden wäre. Meinen Eltern, die mir viel mehr mitgaben als DNA. Ich hoffe sie wissen wie dankbar ich ihnen für alles bin!

Zuletzt gilt mein Dank einer tollen Frau: Julia Baur, für die wunderbaren Jahre aber am meisten dafür, dass sie so ist wie sie ist.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Themenstellung.....	4
3	Theoretischer Hintergrund.....	6
3.1	Cyaninfarbstoffe und CylQ	6
3.2	Fluoreszenzmarkierung von Oligonukleotiden / DNA Sonden.....	9
3.3	Excitonische Wechselwirkungen und Excimere	14
3.4	DNA-Nanopartikel.....	21
3.4.1	Nanopartikel und ihre Anwendungen	21
3.4.2	Upconversion Nanopartikel.....	23
3.4.3	Verknüpfung von DNA mit Nanopartikeln	27
3.4.4	Cytotoxizität	30
4	Entwicklung von DNA-Sonden mit CylQ.....	34
4.1	Synthese und Klick-Konjugation.....	35
4.1.1	Synthese des Cyanin Farbstoffs CylQ	35
4.1.2	Synthese des 2'-O-Propargyl-Uridins	36
4.1.3	Synthese modifizierter Oligonukleotide.....	39
4.1.4	Klick-Konjugation mit CylQ	40
4.2	Untersuchung photophysikalischer und elektronischer Eigenschaften	43
4.2.1	Absorptions- und Fluoreszenzverhalten von CylQ.....	43
4.2.2	Redoxeigenschaften	47
4.2.3	Photostabilität	52
4.3	Untersuchung von CylQ-Monomeren	61
4.4	Untersuchung von Interstrang Dimeren.....	66
4.4.1	Homodimere	67
4.4.2	Heterodimere (FRET von CylQ auf Thiazolrot).....	75

4.5	Untersuchung von Intrastrang-Dimeren.....	81
4.5.1	Heterodimere (FRET von CyIQ auf Thiazolrot).....	82
4.5.2	Homodimere („ECHO-Sonden“).....	86
5	Bioanalytische Anwendungen von CyIQ-DNA.....	94
5.1	Detektion von Punktmutationen.....	94
5.2	Korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie	105
7	DNA-funktionalisierte Upconversion-Nanopartikel.....	112
7.1	Methodenentwicklung.....	114
7.2	Charakterisierung	119
8	Anwendungen von UCNP-DNA Konjugaten.....	122
8.1	Quervernetzung durch Ziel-DNA	122
8.2	Zelluläre Bildgebung.....	129
8.3	Untersuchungen zur Cytotoxizität.....	132
9	Zusammenfassung.....	136
9.1	Funktionelle DNA-Sonden mit CyIQ	136
9.2	DNA-modifizierte Upconversion-Nanopartikel	138
10	Materialien und Methoden	139
10.1	Materialien, Geräte und allgemeine Methoden.....	139
10.2	Optische Spektroskopie	145
10.3	Synthesevorschriften.....	147
10.3.1	Darstellung des Cyaninfarbstoffs CyIQ.....	147
10.3.2	Darstellung des 2'-Propargyl modifizierten Uridins.....	151
10.4	DNA-Synthese	157
10.4.1	Synthese modifizierter Oligonukleotide.....	157
10.4.2	Aufarbeitung und Charakterisierung der Oligonukleotide	159
10.5	Upconversion Nanopartikel	160

10.6	Klickreaktion.....	162
10.6.1	Klickreaktion von Oligonukleotiden mit CylQ	162
10.6.2	Klickreaktion von DNA mit Upconversion-Nanopartikeln	163
10.6.3	Aufarbeitung und Reinigung von UCNP-DNA-Konjugaten	164
10.7	Untersuchungen von CylQ-DNA	165
10.8	Zellkulturen und Versuche.....	167
10.9	Liste verwendeter DNA-Sequenzen	169
11	Literaturverzeichnis.....	173

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin, 2'-Desoxyadenosin
abs.	absolut
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
B	Helligkeit (<i>brightness</i> ; $B = \varepsilon \cdot \Phi$)
C	Cytosin, 2'-Desoxycytidin
CD	Circulardichroismus
CI	Chemische Ionisation
CPG	<i>Controlled Pore Glass</i>
CyIQ	<i>Cyanine Indole Quinoline</i>
d	Dublett, Schichtdicke
Da	Dalton = g/mol
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
d. h.	das heißt
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMF	Dimethylformamid
DMT	4,4'-Dimethoxytrityl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
d. Th.	der Theorie
entspr.	entspricht, entsprechend
EI	Elektrische Ionisation
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
ESI	Elektrosprayionisation
FAB	<i>Fast Atom Bombardment</i> (Ionisierungsmethode in der MS)
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> (Durchflusscytometrie)
FRET	Fluoreszenzresonanz-Energietransfer
exc	Anregung (<i>excitation</i>)
FKS	Fötales Kälberserum
GPC	Gel-Permeations-Chromatographie (entspricht SEC)

isokrat.	isokratisch
<i>J</i>	Kopplungskonstante
kU	klick-Uridin (2'-O-Propargyl-Uridin)
h	Stunde
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Hochleistungs-flüssigkeitschromatographie)
HR-MS	Hochauflösende Massenspektroskopie (HR = <i>high resolution</i>)
Hz	Hertz
i. d. R.	in der Regel
IR	Infrarot ($\lambda = 780 \text{ nm} - 1 \text{ mm}$), Infrarotspektroskopie
LC	<i>Liquid Chromatography</i>
m	Multiplett
M	molar; mol/L
MALDI	<i>Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization</i>
mbar	Millibar
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
min.	Minute
mL	Milliliter
mm	Millimeter
MS	Massenspektrometrie
m/z	Verhältnis Masse zu Ladung
n_D^{20}	Brechungsindex bei 20 °C und Deuteriumlampe
Na-P _i	Natriumphosphatpuffer
NIR	Nahes Infrarot ($\lambda = 780 \text{ nm} - 3 \text{ }\mu\text{m}$)
NHE	Normalwasserstoff-Elektrode
nm	Nanometer
NMR	Kernspinmagnetresonanz (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
NP	Nanopartikel
P _o	Ausgangsleistung Laser (<i>optical output power</i>)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>

ppm	<i>parts per million</i>
RP	<i>Reversed Phase</i>
RT	Raumtemperatur
rpm	<i>rotations per minute</i>
s	Singulett, Sekunde
SEC	<i>Size Exclusion Chromatography</i> (Größenausschlusschromatographie) veraltete Bezeichnung für GPC
s. o.	siehe oben
T	Thymin, 2'-Desoxythymidin
T _m	Schmelzpunkt [°C]
TBTA	tris-(Benzyltriazolylmethyl)amine
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Trimethylsilyl
TO	Thiazolorange
TOF	<i>Time of Flight</i>
TR	Thiazolrot
UC	<i>Upconversion</i>
UCNP	<i>Upconversion</i> Nanopartikel
UV/Vis	Ultraviolette- und sichtbares Lichtspektrum (190 – 800 nm)
V	Volt
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

Symbole

λ	Wellenlänge
Å	Ångström
Ø	Durchmesser, Durchschnitt
δ	Chemische Verschiebung

°C	Grad Celcius
μm	Mikrometer
τ _f	Fluoreszenzlebenszeit
Φ _F	Fluoreszenzquantenausbeute
λ _{max/A}	Wellenlänge des Absorptionsmaximums
λ _{max/F}	Wellenlänge des Fluoreszenzmaximums
Δλ _{F – A}	Stokes-Verschiebung (λ _{max/F} - λ _{max/A})

Die in dieser Arbeit verwendete Nomenklatur orientiert sich an den Chemical Abstracts^[a] und an den von der IUPAC-IUB-Kommission^[b] empfohlenen Richtlinien. Fachausdrücke aus dem Englischen werden *kursiv* gedruckt. Die Schreibweise von Fachausdrücken orientiert sich am DUDEN für chemische Fachausdrücke.^[c] Nach DIN5008 wird als Dezimaltrennzeichen das Komma verwendet.

[a] Chemical Abstracts, Index Guide, 77.

[b] i) IUPAC Commision on Nomenclature of Organic Chemistry (CNOC) und UPACIUB Joint Commision on Biochemical Nomenclature (JCBN), *Biochemistry* **1971**, 10, 3983-4004. ii) IUPAC-IUB (CBN); Tentative Rules for Carbohydrate Nomenclature, *Eur. J. Biochem.* **1971**, 21, 455-477.

[c] O.-A. Neumüller, Duden – Das Wörterbuch chemischer Fachausdrücke, *Bibliographisches Institut, Mannheim*, **2003**, Auflage.

1 Einleitung

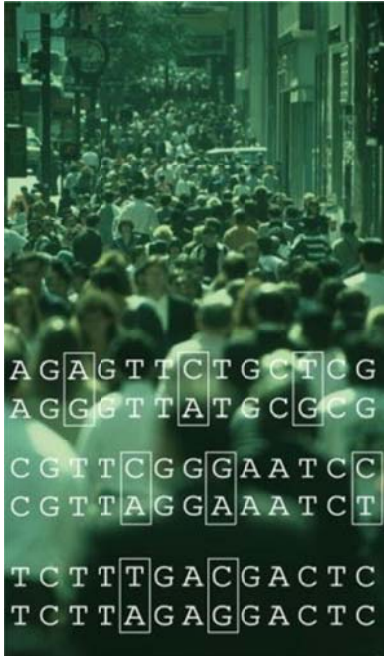


Abb. 1: Die DNA des Menschen unterliegt dynamischen Veränderungen, die Einfluss auf dessen genetisches Programm haben.
Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit.^[1]
© Nature Publishing Group 2001.

Lange Zeit war man der Ansicht, dass der Phänotyp des Menschen und vor allem Teile dessen gesundheitlicher Veranlagungen fest durch den genetischen Code determiniert sind. Mittlerweile wissen wir, dass dem nicht so ist. Wir verstehen immer mehr, dass einzelne DNA-Basen und komplette Gene auf die Interaktion des Menschen mit seiner Umwelt dynamisch reagieren und durch ganz unterschiedliche Einflüsse an- bzw. abgeschaltet werden können.^[2] So haben z. B. unsere Lebens- und Essgewohnheiten einen entscheidenden Einfluss auf unser genetisches Programm.^[3] Diese als Epigenetik bezeichnete Disziplin der Wissenschaft steht trotz grundlegender Erkenntnisse aber erst am Anfang.^[4] Zum anderen wissen wir bereits seit längerem, dass sich unsere genetische Ausstattung nicht gleicht. Individuen unterscheiden sich in

mindestens 1 % ihrer DNA-Sequenz.^[5-7] Bei insgesamt drei Milliarden Basenpaaren ist das eine ganze Menge. Bei diesen Abweichungen des genetischen Codes handelt sich um sogenannte Einzelbasenmutationen (SNPs, *single nucleotide polymorphisms*) der DNA.^[8] Sie sind der Grund für unsere Individualität, denn sie haben z. B. Einfluss auf unser Aussehen. Liegen diese Punktmutationen jedoch auf gesundheitsrelevanten codierenden Bereichen unseres Genoms, so können falsche Translation- und Transkriptionsprodukte entstehen. Das Resultat sind im schlimmsten Fall schwere Erkrankungen wie Krebs^[9] oder Morbus Alzheimer.^[10] SNPs haben aber auch einen Einfluss darauf, ob bestimmte Medikamente bei einem Teil der Menschen besser als bei einem anderen wirken,^[11, 12] da z. B. Rezeptoren in ihrer Proteinstruktur unterschiedlich aufgebaut werden und sich dadurch ihre Funktion verändert.

Auf ähnliche Weise verändern Schäden an unseren DNA-Basen den genetischen Code.^[13, 14] Täglich wird unsere DNA durch UV-Strahlung, Chemikalien oder reaktive Sauerstoffspezies tausendfach geschädigt. In aller Regel merken wir davon nichts, da sie mit einer beispiellosen Effizienz repariert werden.^[15, 16] Aber nicht immer. Ein Beispiel: In über 50 % aller Tumoren findet man eine inaktive Variante des Tumorsuppressorproteins p53.^[17-20] Die Ursache für diese Inaktivität liegt in einem DNA-Schaden der durch die Reperaturmechanismen des Körpers nicht behoben wurde.

Diese Beispiele verdeutlichen, dass wir einerseits verstehen und detektieren können, wie sich unsere DNA auf molekularer Ebene durch bestimmte Einflüsse verändert. Wie steht es aber um die Möglichkeit, darauf Einfluss zu nehmen und Schäden zu beheben bevor eine Krankheit ausbricht? Einige der wichtigsten Erkenntnisse dazu stammen von *Andrew Fire* und *Craig Mello*.^[21, 22] Sie erkannten, dass Gene ganz gezielt durch kurze RNA-Stücke (siRNA) abgeschaltet werden können. Für die Arbeiten zu diesen als Gene-Silencing oder RNA-Interferenz bezeichneten Vorgängen erhielten *Fire* und *Mellow* 2006 den Nobelpreis für Medizin. Aber auch andere Ansätze wie z. B. die Gentherapie, bei der ein defektes Gen durch eine intaktes ausgetauscht wird, bieten ungeahnte Möglichkeiten.

Wir verstehen erstmals, wie bestimmte Prägungen oder Krankheiten auf molekulargenetischer Ebene entstehen oder sich verändern. Zusätzlich haben wir erstmals die Möglichkeit, bestimmte Krankheiten ursächlich zu behandeln bzw. sie gezielt zu verhindern. All diese Erkenntnisse fundieren auf wissenschaftlichen Ergebnissen die durch bioanalytische Verfahren realisiert wurden. Dabei spielt die fluoreszente Bildgebung und Diagnostik eine große Rolle. Neben der intrinsischen Fluoreszenz, wie beispielsweise der des GFP (*green fluorescent protein*), bieten artifizielle Fluorophore wie z. B. Cyaninfarbstoffe, ein großes Anwendungsspektrum. Man findet sie in fast allen Bereichen moderner bioanalytischer Methoden, wie der Fluoreszenzmikroskopie, Polymerasekettenreaktion und in DNA- oder Protein-Arrays. Mit der rasanten Entwicklung technischer Möglichkeiten wächst neben den etablierten Fluoreszenzsystemen auch der Bedarf an Neuartigen. In der Grundlagenforschung werden Chromophore benötigt, die ganz spezielle Strukturen wie z. B. DNA Einzelbasenmutationen und G-Quadruplexe detektieren oder Protein-DNA-Interaktionen visualisieren können. In der Zellbiologie werden durch immer

höherer Auflösungen der Mikroskope und dem Einsatz von Lasern Farbstoffe gesucht, die den gestiegenen technischen Anforderungen gerecht werden. Auch für die etablierten Methoden der DNA Analytik sind neuartige Fluorophorsysteme interessant, da sie durch zusätzliche Funktionen, wie z. B. Farbwechsel, das Leistungsspektrum bisheriger Sensoren oder Arrays erweitern können.

Die Bioanalytik bildet die Grundlage für das Verständnis der Prozesse unserer DNA und RNA. Der Weiterentwicklung der bioanalytischen Methoden kommt daher eine große Bedeutung zu. Diese Arbeit soll dazu einen kleinen Beitrag liefern, indem zwei neue fluoreszente DNA-Sonden entwickelt und validiert werden.

2 Themenstellung

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf fluoreszenten DNA-Sonden für die Nukleinsäureanalytik und der Fluoreszenzmikroskopie. Neben anderen Forschungsgruppen entstanden auch in der Gruppe von *Wagenknecht* in den letzten Jahren vielversprechende Fluoreszenzsonden auf der Basis von *Molecular Beacons*.^[23, 24] Dabei erwiesen sich die beiden Farbstoffe Thiazolorange und Thiazolrot, alleine oder in Kombination, als äußerst erfolgreich. Beides sind Cyaninfarbstoffe, die während der DNA-Synthese in die Oligonukleotide geknüpft wurden. Auch eigene Arbeiten konnten bereits zeigen, dass sogar etablierte Farbstoffe, wie Cy3, ihr Leistungsspektrum erweitern können, wenn sie zusammen mit einem Elektronenakzeptor in DNA eingebaut werden.^[25] Auf Grundlage dieser Erkenntnisse sollen weitere Sonden entwickelt werden, die vor allem das Anwendungsspektrum von Fluorophoren erweitern. Für die Entwicklung neuer Fluorophore bzw. fluoreszierender DNA-Sonden lassen sich einige Eigenschaften als grundsätzliche Zielvorgabe formulieren (s. Tabelle 1):

Tabelle 1: Anforderungen an neuartige Fluorophorsysteme.

Eigenschaft	Hintergrund
Anregung über $\lambda = 450 \text{ nm}$	Geringe Autofluoreszenz und hohe Eindringtiefe in biologische Medien.
Große Stokes Verschiebung	Erfassung eines großen Emissionsbereichs und Verringerung von Autofluoreszenz.
Photostabilität	Geringes Ausbleichen ermöglicht die zuverlässige Erfassung von Signalen über lange Zeiträume.
Geringe Toxizität	Ermöglicht die ungestörte Erfassung längerer Zellprozesse und einen Einsatz der Sonde in vivo.
Helligkeit	Abhebung des Signals von Hintergrundfluoreszenz und Grundvoraussetzung der fluoreszenten Bildgebung.
Synthese	Geringer Syntheseaufwand zur Kostenreduzierung; einfache Handhabung zur postsynthetischen Modifikation erweitert das Einsatzspektrum; Biokompatibilität

Teil 1 Entwicklung des Cyaninfarbstoffs CylQ und funktionelle DNA Sonden:

Im Hauptteil dieser Arbeit soll ein Cyaninfarbstoff (CylQ, *Cyanine Indole Quinoline*) so weiterentwickelt und synthetisiert werden, dass er universell und postsynthetisch mit DNA verknüpft werden kann. Dies soll über eine kupferkatalysierte Cycloaddition zwischen einem alkinmodifizierten Nukleosid und dem azidmodifizierten Farbstoff realisiert und validiert werden. In einem zweiten Schritt sollen die grundlegenden photophysikalischen Eigenschaften des Farbstoffs in Verbindung mit DNA untersucht werden. Danach werden unterschiedliche fluoreszente Oligomere aufgebaut, die durch die Kombination mit CylQ selbst oder Thiazolrot funktionelle Sonden ergeben. Das Ziel ist es, eine Sonde zu finden, die durch Farbwechsel oder Fluoreszenzlöschung Bindungsvorgänge visualisieren kann. Abschließend soll anhand zweier ganz unterschiedlicher Anwendungsbeispiele das Potential der CylQ-Sonden nachgewiesen werden. Dafür wird einerseits eine CylQ-Dimer-Sonde für die Detektion von Basenfehlpaarungen verwendet. Eine andere CylQ-DNA-Sonde soll die Visualisierung von DNA auf dem Weg in eukaryontische Zellen sowohl im Lichtmikroskop (*live cell imaging*) als auch im hochauflösenden Elektronenmikroskop ermöglichen.

Teil 2 DNA-modifizierte Upconversion-Nanopartikel

Im zweiten Teil dieser Arbeit soll eine Methode zur Oberflächenfunktionalisierung von Upconversion-Nanopartikeln mit DNA auf Basis der Klick-Reaktion entwickelt und validiert werden. Sogenannte Upconversion-Materialien zeigen intensive Fluoreszenz im sichtbaren Spektralbereich bei Anregung im energiearmen Infrarotbereich. Diese Eigenschaft macht Upconversion-Nanopartikel besonders interessant für die Fluoreszenzmikroskopie, da keinerlei Hintergrundemission auftreten sollte. Diese Eigenschaften sollen vergleichend für unmodifizierte und DNA-modifizierte Upconversion-Nanopartikel untersucht werden. Die DNA verleiht den Nanopartikeln durch ihre Sequenz die Möglichkeit der molekularen Erkennung, was durch DNA gesteuerte Hybridisierung nachgewiesen werden soll. Dieser Teil der Arbeit entstammt einem Kooperationsprojekt mit der Forschungsgruppe von *Prof. Wolfbeis* am Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik der Universität Regensburg.

3 Theoretischer Hintergrund

3.1 Cyaninfarbstoffe und CylQ

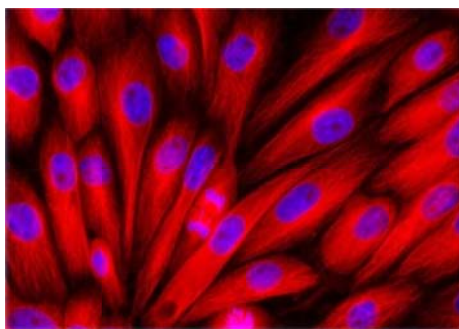


Abb. 2: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Cy3 (rot) und DAPI (blau) gefärbten Zellen (LLC-PK1). (© Olympus America, Inc. 2010)^[26]

„Beides, Kunst und Wissenschaft basieren auf Kreativität und Vorstellungskraft.“^[27] Dieses Zitat von Rolf Huisgen passt gut zu der Arbeit mit Farbstoffmolekülen. Fluoreszierende Farbstoffe liefern in mikroskopischen Aufnahmen wahre Kunstwerke. Für die Wissenschaft spielt dabei die Vorstellungskraft und Kreativität hinsichtlich Molekülstruktur, Wechselwirkungen des Chromophors mit der Mikroumgebung (z.B. DNA)

und dem Moleküldesign eine wichtige Rolle. In dieser Arbeit steht die Klasse der Cyaninfarbstoffe im Mittelpunkt. Sie sind als klassische organische Farbstoffe schon seit über 150 Jahren bekannt^[28] und seither in einer Vielzahl von Strukturen für unterschiedliche Anwendungen synthetisiert worden.^[29] Ihre Farbigkeit verdanken sie einem ausgedehnten π -Elektronensystem, das durch eine für diese Farbstoffklasse charakteristische Polymethinbrücke verknüpft ist. Deshalb wird sie auch der Gruppe der Polymethinfarbstoffe zugeordnet. Diese Polymethin-Brücke verknüpft eine tertiäre Aminogruppe als Elektronendonator (Auxochrom) einerseits mit einer quartären Ammonium-Gruppe als Elektronenakzeptor (Antiauxochrom) andererseits.^[29] Es handelt sich also um eine Kombination aus Polyenen und Aromaten. Bei Cyaninfarbstoffen sind drei Arten zu unterscheiden (s. Abb. 3a). Die Länge der Polymethinbrücke hat einen entscheidenden Einfluss auf die Farbigkeit. Mit zunehmender Kettenlänge wird der HOMO-LUMO-Abstand geringer und somit die Absorptionswellenlänge bathochrom verschoben.^[30] Die Polymethinbrücke besteht aus einer ungeraden Anzahl von Methin-Einheiten, dabei aber immer aus einer geraden Anzahl an π -Elektronen.

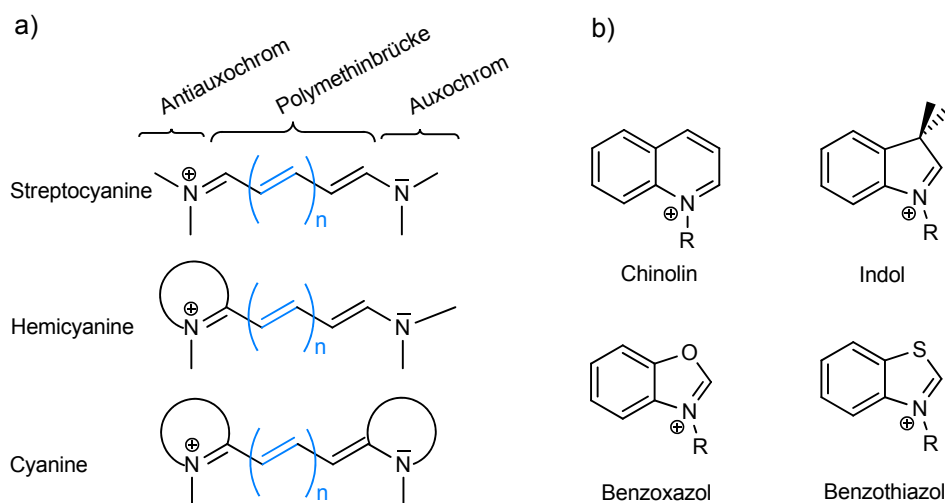


Abb. 3: **a)** Die drei Klassen von Cyaninfarbstoffen: Offenkettige Cyaninfarbstoffe (Strepto-Cyanine), Hemi-Cyaninfarbstoffe und geschlossenkettige Cyaninfarbstoffe. **b)** Typische Heterocyclische Komponenten von Cyaninfarbstoffen. R ist meist eine Alkylgruppe, Alkylsulfongruppe oder die Verknüpfungsstelle bei kovalenten Biomarkern.

Cyanine im Grundzustand liegen typischerweise in der *all-trans* Konformation vor, zeigen aber eine ausgeprägte *cis-trans*-Photoisomerisierung.^[31] Die Rotation um die C-C-Bindung ist bei kurzen Methinbrücken ($n = 1$) sehr ausgeprägt, was sich in kurzen Lebenszeiten ($\tau_f = 15 - 500$ ps Monomethincyaninen; $\tau_f = 1 - 2$ ns Dimethincyaninen) des photoangeregten S_1 -Zustandes und geringen Fluoreszenzquantenausbeuten zeigt.^[32-34] Im Umkehrschluss steigt die Fluoreszenz bei Fixierung der Rotation stark an. Die photophysikalischen Eigenschaften können auch durch die konjugierten Heterocyclen, z. B. durch Einbringen weiterer Heteroatome (S, O oder Se), verändert werden. Je nach Struktur der konjugierten Heterocyclen ergeben sich symmetrische (gleiche Heterocyclen) und unsymmetrische (unterschiedliche Heterocyclen) Cyanine. Typischerweise absorbieren diese Chromophore in einem Wellenlängenbereich von 400 - 1000 nm. Viele davon zeigen auch Fluoreszenz. Neben der Emission sind Innere Umwandlung (IC, Internal Conversion) und Rotation die effizientesten Deaktivierungsprozesse des photoangeregten Singulett-Zustandes. Cyaninfarbstoffe sind in vielen organischen Lösungsmitteln und meist auch in Wasser löslich, wobei die Löslichkeit hierfür oft durch Alkylsulfonate verbessert wird. Trotzdem neigen Cyanine zur Aggregation, was oft mit einer Veränderung ihrer photophysikalischen Eigenschaften einhergeht (s. Kapitel 3.3). In Verbindung mit DNA zeigen diese Farbstoffe in einigen Fällen Fluoreszenzlöschung zum Beispiel

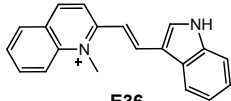
durch Elektronentransfer.^[25] Aktuelle Übersichtsartikel von *Levitus et al.*^[31] und *Armitage*^[28] sowie eigene Arbeiten^[25] beleuchten das photophysikalische Verhalten von Polymethinfarbstoffen im Allgemeinen und in Verbindung mit DNA genauer.

All diese Eigenschaften machen Cyaninfarbstoffe zu einem wichtigen Arbeitsmittel der Bioanalytik. Bekannte Vertreter wie Cy3, Cy5, SYBR Green, TOTO oder YOYO, gehören mittlerweile zum Standardrepertoire molekularbiologischer Untersuchungsmethoden wie der Fluoreszenzmikroskopie, Gelelektrophorese, Proteinmarkierung (z.B. für Proteinarrays, Antikörperkopplungen) oder der DNA- und RNA Markierung (z.B. DNA Mikroarrays, Chromosomensonden, PCR). Neben den Grundeigenschaften zeigen Cyaninfarbstoffe oft intensive Wechselwirkungen mit ihrer Umgebung, was in der Bioanalytik gerade dann interessant ist, wenn bestimmte Strukturen oder strukturelle Änderungen der Mikroumgebung detektiert werden sollen.

In dieser Arbeit wird ein Cyaninfarbstoff weiterentwickelt, dessen Grundstruktur als E36 von *Yong-Tae Chang* veröffentlicht^[35, 36] und patentiert^[37] wurde. Ursprünglich wird der Farbstoff als Styrylfarbstoff geführt, was jedoch nicht ganz zutreffend ist, da der Name kennzeichnend für Cyaninfarbstoffe mit Styrol-Einheiten ist und diese in E36 fehlen.^[38] Im Rahmen dieser Arbeit wird der weiterentwickelte Farbstoff als CylQ (Cyanine Indole Quinoline) bezeichnet. Das Grundgerüst E36 ging aus einem Farbstoffscreening hervor, bei dem eine Reihe von kationischen Fluorophoren auf ihre Fähigkeit hin untersucht wurden, in lebenden Zellen spezifisch RNA anzufärben. Dabei ging es hauptsächlich darum, Chromophore zu finden, welche die Zellmembran überwinden und spezifisch an RNA und nicht an DNA binden. Üblicherweise erfolgt dies per Mikroinjektion eines Fluorophors oder über Hybride aus RNA bindenden und fluoreszierenden Peptiden (z. B. GFP), was für die Visualisierung globaler RNA-Prozesse in der Zelle wenig geeignet ist. Ein Hauptziel ist es, RNA im Nukleus und Nukleolus in lebenden Zellen zu verfolgen. In unterschiedlichen Zelllinien konnte gezeigt werden, dass dies unter anderem mit E36 möglich ist. Der Farbstoff zeigt dabei eine geringe Zell- und Phototoxizität. In Titrationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass E36 besser an RNA als an DNA bindet, was sich durch einen fast doppelt so hohen Fluoreszenzanstieg bei RNA erklärt. Die optischen Eigenschaften, die in Tabelle 2 zusammengefasst sind, geben Anlass, den Farbstoff weiterzuentwickeln und

kovalent mit DNA zu verknüpfen. Eine kovalente Verknüpfung des Farbstoffs mit DNA ist bisher nicht bekannt.

Tabelle 2: Optische Eigenschaften der Grundstruktur (E36) von CylQ nach *Chang et al.*^[35]

Struktur	$\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$ [nm]		$\Phi_{\text{F}}^{\text{Puffer}}$	$\Phi_{\text{F}}^{\text{RNA}}$	ϵ_{Puffer} [M ⁻¹ cm ⁻¹]	ϵ_{RNA} [M ⁻¹ cm ⁻¹]
	Puffer	RNA				
 E36	457/541	497/548	0,002	0,1	$3,94 \times 10^4$	$4,31 \times 10^4$

3.2 Fluoreszenzmarkierung von Oligonukleotiden / DNA Sonden

Die natürlichen Nukleoside A, G, C und T zeigen nahezu keine intrinsische Emission ($\Phi_{\text{F}} = 0,5 - 3 \times 10^{-4}$).^[39, 40] Eine direkte Fluoreszenzdetektion ist also nicht möglich, schafft aber gleichzeitig die Möglichkeit, Fluorophore in DNA einzuführen und diese ohne Hintergrundemission zu detektieren. Grundsätzlich können Farbstoffe kovalent mit DNA verbunden werden oder als freier Farbstoff mit der DNA in Wechselwirkung treten. Freie Farbstoffe interkalieren dabei entweder in den Basenstapel (Interkalatoren) oder binden in eine Furche der Doppelhelix (*groove binder*). Gleiches gilt für RNA. Im Rahmen dieser Arbeit werden Farbstoffe kovalent in Oligomere eingebaut, weshalb sich dieses Kapitel grundsätzlich mit Varianten für den kovalenten Einbau beschäftigt. Dazu stehen vier Möglichkeiten zur Verfügung.^[41, 42]

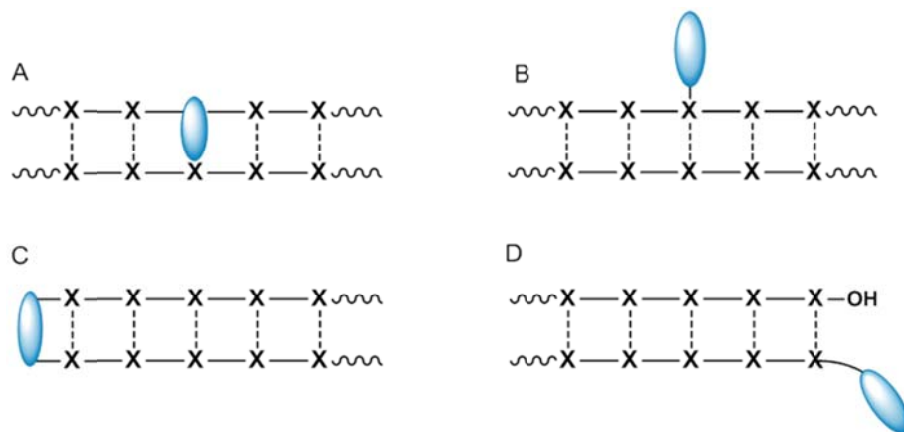


Abb. 4: Unterschiedliche Möglichkeiten zur kovalenten Verknüpfung von Fluorophoren mit DNA. (Abbildung nach Vorbild von Wagenknecht aus Lit.^[41]).

A) Einbau als artifizielle Nukleobase

Der Chromophor wird über einen nichtnukleosidischen Linker oder eine Desoxyribose im Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA an Stelle eines natürlichen Nukleosids eingebaut. In dieser Arbeit wurde das mit Thiazolrot durchgeführt, dass über einen acyklischen Linker während der DNA-Synthese eingebaut wurde.

B) Kovalente Verknüpfung mit einem natürlichen Nukleosid

Der Fluorophor wird mit einem natürlichen Nukleosid meist an der Base verknüpft. Dies kann entweder vor der Oligonukleotidsynthese oder im Anschluss daran realisiert werden. In dieser Arbeit wurde CylQ an die 2'-Position eines Uridins verknüpft.

C) Einbau als Kopfgruppe einer DNA-Haarnadel

Der Marker verbindet über Linkergruppen einen DNA-Strang, der selbstkomplementär sein kann. Bildet sich hierbei ein Duplex, so liegt die Fluoreszenzsonde auf dem Basenstapel. Solche Strukturen sind recht stabil, nehmen meist eine B-DNA-Konformation ein und denaturieren erst bei hoher Temperatur.

D) Terminale Verknüpfung

Dies ist der am meisten verbreitete und etablierte Ansatz. Der Fluoreszenzfarbstoff wird über einen Linker am 3'- oder 5'-Ende mit der DNA verknüpft. Die Sonde dient meist lediglich als Marker der DNA. Die typischen Vertreter sind Cy3 und Cy5.

Die kovalente Verknüpfung von DNA mit Farbstoffen bringt einige Vorteile mit sich. Zum einen lässt sich die Position des Fluorophors in der Sequenz exakt bestimmen, was zu definierten Strukturen führt. Des Weiteren ergibt sich aus der Natur einer festen Verknüpfung die Möglichkeit, die Position von DNA oder RNA z. B. in Zellen zu visualisieren. Kovalent gebundene Fluoreszenzsonden sind damit ein praktikabler Ersatz für radioaktive Marker und Interkalatoren.

Neben dem direkten Einbau von Fluorophoren während der DNA-Synthese gibt es die Möglichkeit der postsynthetischen Modifikation. Dabei wird eine reaktive Gruppe während der DNA-Synthese in das Oligomer eingebracht, an die später ein Fluorophor chemoselektiv gebunden wird. Der Vorteil dieser Methode ist, dass auch Bausteine, die nicht mit der DNA-Festphasenchemie kompatibel sind, verknüpft werden können. Für diesen Ansatz sind mild ablaufende Reaktionen nötig, die spezifisch, bioorthogonal und am Besten in wässrigen Lösungen funktionieren. In den letzten Jahren entstanden einige vielversprechende Ansätze die über Diels-Alder Reaktion, Staudinger-Ligation, Huisgen-Reaktion oder über thiolmodifizierte DNA ablaufen. In einem Übersichtsartikel von *Marx et al.* werden einige dieser Möglichkeiten genauer beleuchtet.^[43] In **Abb. 5** sind die wichtigsten Möglichkeiten zur postsynthetischen Funktionalisierung von DNA zusammengefasst.

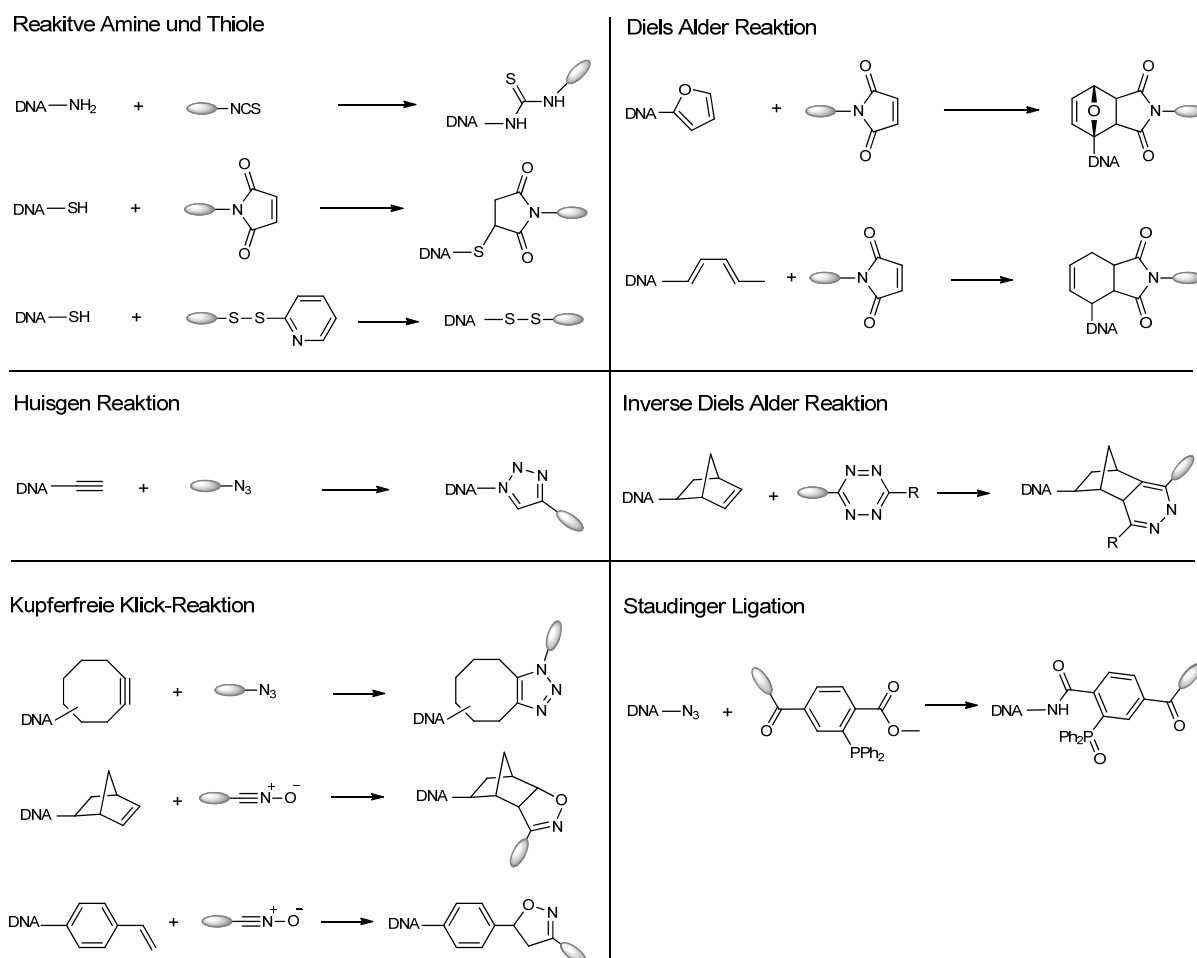


Abb. 5: Einige Möglichkeiten zur postsynthetischen Funktionalisierung von DNA.^[43-48]

In dieser Arbeit wurde die kupferkatalysierte [2+3]-Cycloaddition zwischen Alkinen und Aziden nach Huisgen,^[49, 50] Sharpless,^[51] und Meldal^[52] umgesetzt. Die Reaktion ist der bekannteste Vertreter der Klick-Reaktionen. *Thomas Carell* schreibt 2008 in einem Übersichtsartikel: Die Klick Konjugation ist „...auf dem besten Wege, die Synthese funktionalisierter DNA-Stränge zu revolutionieren“.^[53] Er fasst damit sehr treffend zusammen wie sich dieser Ansatz in den letzten Jahren entwickelt hat und welches Potential er birgt.^[54] Die Methode wurde bereits von einigen Gruppen in unterschiedlicher Weise umgesetzt. Tabelle 3 soll hierüber einen kurzen Überblick verschaffen. Chemische Details zur Reaktion finden sich in Kapitel 4.1.4, die Klick-Konjugation von DNA mit Nanopartikeln wird in den Kapiteln 3.4.3 und 7.1 besprochen. Seit Kurzem sind auch kupferfreie Varianten der Cycloaddition mit DNA

bekannt. Hierbei werden die Reaktionen über gespannte Cyclooctinderivate^[46, 55] (oder Nitriloxidverbindungen^[47, 48, 56] ermöglicht (s. **Abb. 5**).

Tabelle 3: Übersicht einiger Anwendungsbeispiele der Klick-Konjugation von Aziden mit Alkinen in Bezug auf Nukleinsäuren.

Lit.	Anwendung
[57, 58]	Klick-Konjugation kleiner, z. T. biogener Moleküle an RNA und siRNA.
[59]	Sequenzielle Click-Reaktion von drei unterschiedlichen Molekülen an DNA durch variierende Schutzgruppen.
[60]	Fluorogene Klick-Reaktionen (Übersicht).
[61]	Fluorophore für die kupferfreie und/oder kupferkatalysierte Klick-Konjugation von Biomolekülen.
[62-64]	Klick-Reaktion an octinmodifizierten Uridinen (bis zu sechs Funktionalisierungen).
[65]	Immobilisierung von DNA auf Glasoberfläche via Klick-Reaktion.
[66-69]	DNA-Ligation (<i>cross linking</i>) und Cyclisierungen von DNA durch Klick-Reaktion.
[43, 53, 54, 70]	Übersichtsartikel.

Auch die Gruppe von *Wagenknecht* nutzte die Klick Reaktion bereits, um z. B. IR-emittierende Farbstoffe^[71] oder Nilblau^[72] an alkinmodifizierte Uridine oder acyclische Basensurrogate zu knüpfen. 2009 verglichen sie zusammen mit *Wolfbeis et al.* unterschiedliche Klickbausteine und konnten zeigen, dass 2'-O-Propargyluridin einem acyklischen Alkin vorzuziehen ist, da die DNA-Stabilität durch Basenpaarung des Uracils intakt bleibt.^[73]

Die Gruppe von *Carell* zeigte bereits, in welche Richtung sich die Klick-Konjugation weiterentwickeln könnte. Sie konnten durch Polymerasekettenreaktion unterschiedliche alkin- und azidfunktionalisierten Nukleosidtriphosphate in DNA (300, 900 und 2000 Basen) einbauen und diese postsynthetisch modifizieren.^[74, 75] Mit dieser Methode wäre es künftig möglich, nicht nur Oligomere postsynthetisch zu funktionalisieren, sondern große, vielleicht sogar genomische DNA-Sequenzen.

3.3 Excitonische Wechselwirkungen und Excimere

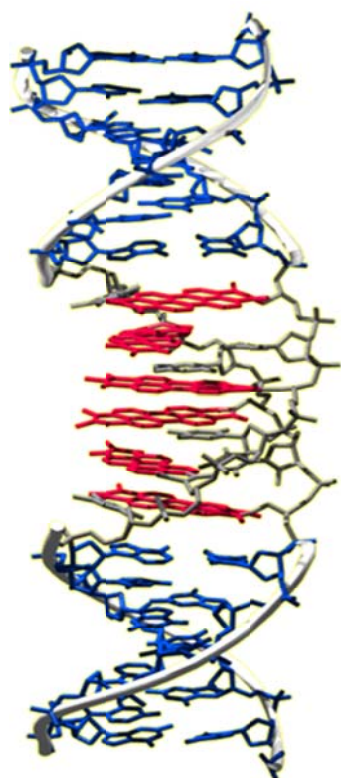


Abb. 6: Beispiel DNA gesteuerter Aggregation von Perylenbisimiden nach *Wagenknecht et al.* ^[76] (Wiedergabe mit Genehmigung Copyright Wiley VCH).

Scheibe^[77] und *Jelly*^[78] beschrieben in den 1930er Jahren ein interessantes Phänomen. Bei der Untersuchung von Cyaninfarbstoffen in wässriger Lösung stellten sie fest, dass sich deren Absorptionsbanden im Vergleich zu ethanolischen Lösungen verändern und schmalbandiger bei niedrigerer Energie absorbieren.^[79] Auch die Emission änderte sich und war deutlich intensiver. Sie hatten intermolekulare Wechselwirkungen zwischen Cyaninen entdeckt, die erst bei deren Aggregation auftreten. Diesen Effekt macht man sich heute zu Nutze, indem man Cyaninfarbstoffe gezielt zur Aggregation bringt und dadurch ihre optischen Eigenschaften verändert. Steuerbar wird dieser Vorgang z. B. durch DNA, die durch ihre Ausbildung helikaler Strukturen die Aggregatbildung bestimmt.^[80-85] Die photo-physikalischen Wechselwirkungen, die sich dahinter verbergen, können mit der Exciton-Kopplungstheorie nach *Kasha*^[86, 87] und *Davydov*^[88] erklärt werden, die im Folgenden anhand von dimeren Farbstoffaggregaten qualitativ erläutert wird. Durch elektronische Anregung (z.

B. Licht) eines Moleküls vom Grundzustand in einen energetisch angeregten Zustand wird ein Molekül polarisiert. Da dieser Zustand temporär ist, bezeichnet man ihn als Übergangsdipolmoment. Sind zwei oder mehrere Moleküle aggregiert, so können deren Übergangsdipolmomente in Wechselwirkung treten. Diese Wechselwirkung zwischen Übergangsdipolmomenten aggregierter Moleküle bezeichnet man als Exciton-Kopplung. Bilden zwei Chromophore eine solche Exciton-Kopplung aus, so spaltet der angeregte Zustand in zwei Niveaus auf, die sich energetisch von dem der Monomere unterscheiden. Dieser Vorgang wird als Davydov-Aufspaltung bezeichnet, die Energiedifferenz zwischen diesen beiden Zuständen als Exciton-Splitting-Energie (s. **Abb. 7**).

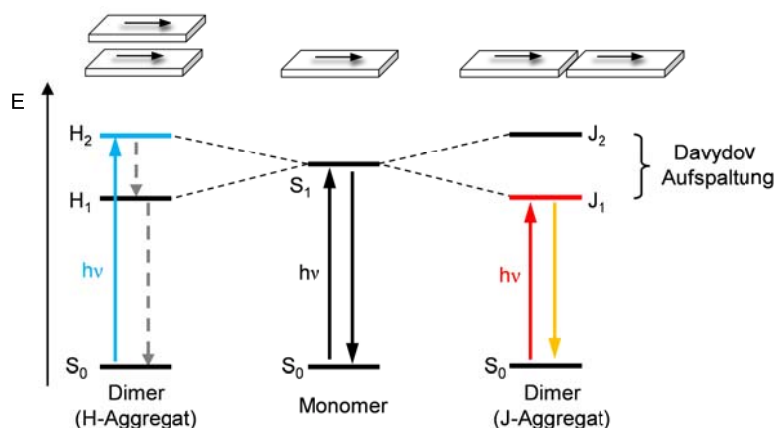


Abb. 7: Energieniveauschema aggregierter Dimere. Werden aggregierte Dimere durch Licht elektronisch angeregt, so kommt es zu excitonischen Wechselwirkungen die zur Aufspaltung des angeregten Zustandes führen (Davydov Aufspaltung = Exciton-Splitting-Energie). Bei H-Aggregaten ist nur eine Anregung des höheren Energieniveaus erlaubt, bei J-Aggregaten nur des niedrigeren (kompakte Pfeile stehen für strahlende Übergänge, gestrichelte Pfeile für Internal Conversion und die kleinen Pfeile repräsentieren die Übergangsdipolmomente in den Chromophoren).

Die Davydov-Aufspaltung ist deutlich in den Absorptionsspektren von Chromophor-Aggregaten zu sehen. Je nachdem, ob bei einem Aggregat das höhere oder niedrigere Energieniveau angeregt wird, ist die Absorptionsbande bathochrom oder hypsochrom im Vergleich zum Monomer verschoben. Genau dieses Phänomen liegt der Beobachtung von *Scheibe* und *Jelley* zu Grunde. Dimere, die eine bathochrome Verschiebung zeigen, werden als J-Aggregate bezeichnet, wobei „J“ für *Jelley* steht. Dimere, die eine hypsochrome Verschiebung zeigen, werden als H-Aggregate bezeichnet. „H“ steht hier für hypsochrom.

Abhängig ist dieser Prozess von der räumlichen Anordnung der Chromophore und deren Übergangsdipolmomente zueinander (s. Abb. 8). Aggregieren die Chromophore so, dass ihre Übergangsdipolmomente parallel zueinander liegen ($\alpha = 90^\circ$), entsteht eine hypsochrome Verschiebung (H-Aggregat), da eine Anregung nur in den energiereichen Zustand (H_2) erlaubt ist. Der in den niedrigeren (H_1) ist verboten. Ordnen sich die Chromophore zu einer Kopf-Schwanz-Verbindung an, so liegen die Übergangsdipolmomente in einer Ebene zueinander ($\alpha = 0^\circ$), und nur ein Übergang in den energieärmeren Zustand (J_1) ist erlaubt. Unsubstituierte Farbstoffe neigen dazu, H-Aggregate zu bilden, da sich dabei die van der Waals Wechselwirkungen maximal nutzen lassen und es den Kontakt mit Wasser

minimiert.^[28] Bei den Übergangsdipolmomenten spielt nicht nur der Verschiebungswinkel α eine wichtige Rolle, sondern auch der Rotationswinkel θ (s.

Abb. 8).

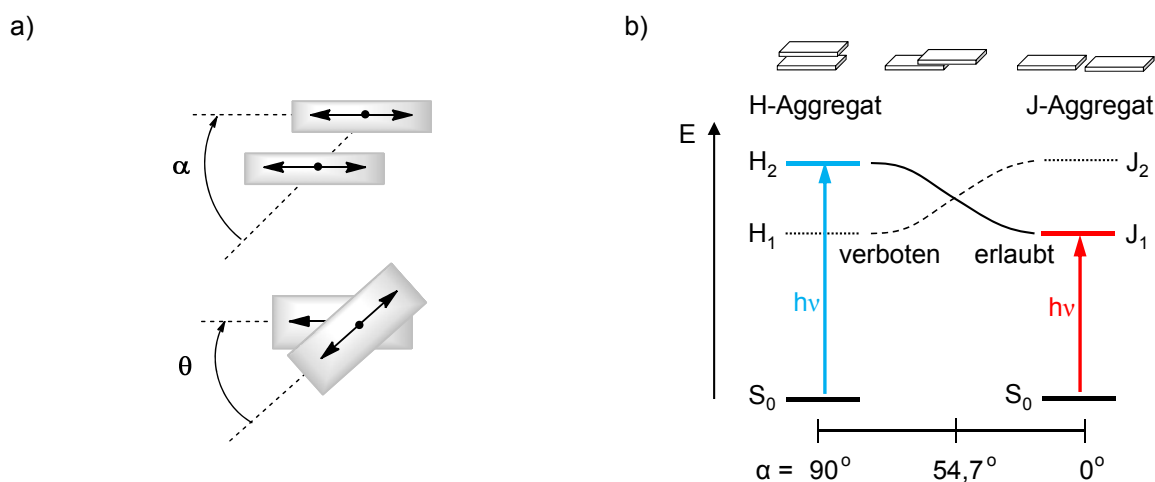


Abb. 8: Einfluss der räumlichen Anordnung coplanarer Chromophor-Dimere und deren Übergangsdipolmomente auf das Absorptionsverhalten. a) Verschiebungswinkel α (Seitenansicht) und Rotationswinkel θ (Draufsicht); Pfeile repräsentieren die Übergangsdipolmomente. b) Zusammenhang zwischen Verschiebungswinkel und Bildung von H- oder J-Aggregaten ($\theta = 0^\circ$).

Durch die Aufspaltung in unterschiedliche Energiezustände verändern sich auch die Relaxationsprozesse und damit die Fluoreszenz. J-Aggregate zeigen Fluoreszenz mit teilweise höheren Quantenausbeuten als die Monomere. Dieser Effekt ist gut beschreiben und seit langem bekannt.^[79] Die Fluoreszenz von H-Aggregaten ist dagegen in den meisten Fällen gelöscht, was ebenfalls seit langem bekannt ist.^[79, 89-92] Nach *Kasha*^[86, 87] und *Förster*^[93] wird der energiereiche Exciton-Zustand der H-Aggregate durch schnelles *Internal Conversion* in einen energetisch niedrigeren Zustand überführt.^[94] Elektronen aus diesem Zustand werden strahlungslos in den Grundzustand transportiert. Die Fluoreszenz wird gelöscht. Bis vor kurzem waren nur seltene Ausnahmen dieser Regel bekannt. Sie wurden bei sehr tiefen Temperaturen^[95-99] oder Monolagen^[100, 101] aggregierter Moleküle beobachtet. *Wortmann* und *Würthner* beschrieben jedoch 2006 fluoreszente H-Aggregate von Merocyaninen unter Normalbedingungen (25 °C, Dioxan).^[89] Den Grund für die theoretisch verbotene Fluoreszenz fanden sie in einer ganz bestimmten Anordnung der Chromophore zueinander ($\alpha = 59,9^\circ$; $\theta = 10^\circ$). Unter diesen Bedingungen

($\alpha > 54,7^\circ$; $\theta \neq 0^\circ$ oder 90°) ist ein Übergang auf das niedrigere Exciton-Niveau möglich und damit Fluoreszenz.

Auch in der Gruppe von *Wagenknecht* wurden fluoreszente H-Aggregate beobachtet.^[102] Sie traten bei Dimeren aus Thiazolorange auf, die durch die DNA in einer antiparallelen Orientierung aggregierten. Auch in diesem Fall war diese Art der Orientierung in Verbindung mit einer helikalen Verdrehung der Übergangsdipolmomente entscheidend. Bemerkenswert ist, dass dies der erste Fall fluoreszenter H-Aggregate in DNA ist.

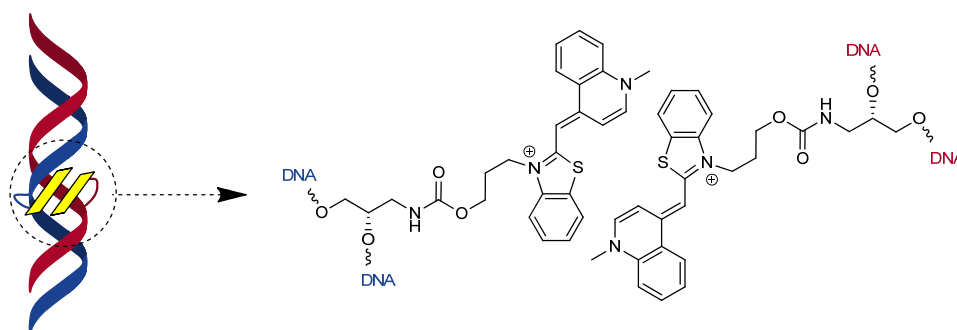


Abb. 9: Thiazolorange Dimere nach *Berndl* und *Wagenknecht*.^[23, 102]

Aus diesem Beispiel wird deutlich, dass bei DNA-gesteuerter Dimer-Bildung die Verknüpfung mit der DNA eine entscheidende Rolle spielt. Zur Steuerung der Aggregate müssen die Linker entsprechende Längen und Verknüpfungen aufweisen. Bei parallel, sehr eng verknüpften Chromophoren in einer Intrastrang Anordnung ist die Ausbildung von H-Aggregaten sehr wahrscheinlich. *Okamoto et al.* nutzen diese Art der Verknüpfung für den Aufbau funktioneller DNA Sonden, indem sie ein mit Thiazolorange doppelt modifiziertes Desoxythymidin in Oligomere einbauten.^[103-106] Diese als ECHO-Sonden („*Exciton-Controlled Hybridization-Sensitive Fluorescent Oligonucleotides*“) bezeichneten Oligomere zeigen im Einzelstrang keine Fluoreszenz, aufgrund gelöschter H-Aggregate. Die Aggregate werden bei Ausbildung eines Doppelstranges aufgelöst und zeigen Monomer-Fluoreszenz. Dieses Thema spielt in Kapitel 4.5.2 noch eine wichtige Rolle.

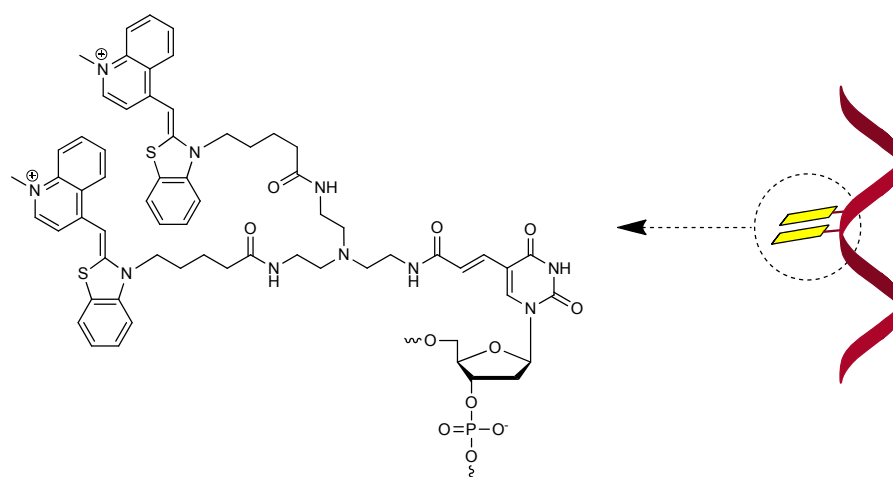


Abb. 10: Thiazolorange Dimere nach Okamoto et al.[103-106]

Abgrenzung zu Excimeren und Exciplexen:

An dieser Stelle muss die Ausbildung von Excimeren als ein weiteres Phänomen von Chromophorwechselwirkungen erwähnt werden, das nicht mit Excitonen verwechselt werden darf. Das Zustandekommen von Excimeren unterscheidet sich dabei grundlegend. Im Vergleich zu excitonisch gekoppelten Aggregaten liegt bei Excimeren nicht von Anfang an ein Aggregat vor, sondern es bildet sich erst, wenn sich einer der beiden Chromophore in einem angeregten Zustand befindet. Man bezeichnet diesen Zustand auch „*excited dimer*“, woraus sich der Begriff Excimer ableitet.^[107-112] Bildet sich ein solches Dimer aus zwei unterschiedlichen Molekülen, so wird das Aggregat als Exciplex bezeichnet, was sich von „*excited complex*“ ableitet.^[107, 113-115] Das Phänomen der Excimer-Bildung ist seit langem bekannt und wurde von Förster und Kaspar ausführlich untersucht.^[116] Die Vorgänge lassen sich anhand eines vereinfachten Energieniveaudiagramms erläutern (Abb. 11 b).^[117]

Bei Annäherung zweier Chromophore steigt deren repulsive Wechselwirkung und damit die Energie zwischen beiden Molekülen. Kommt es trotzdem zu einer weiteren Annäherung, so bildet sich ab einer bestimmten Distanz r aus dem Dimer ein Excimer. Die treibende Kraft dabei ist eine Absenkung der Energie im Excimer-Zustand. Das Excimer kann als neue energetische Spezies betrachtet werden und zeigt charakteristische Eigenschaften hinsichtlich Reaktivität und photophysikalischer Besonderheiten.^[118] Typisch für Excimere ist eine energieärmere und damit rotverschobene Emission. Diese Verschiebung kommt durch Relaxation aus einem

energetisch abgesenkten Niveau^[117] des Excimers oder Exciplexes in den Energiezustand repulsiver Monomere. Charakteristisch ist auch, dass dabei jegliche Feinstruktur verschwindet, da im repulsiven Zustand der Monomere keine diskreten Energiezustände vorliegen.^[119]

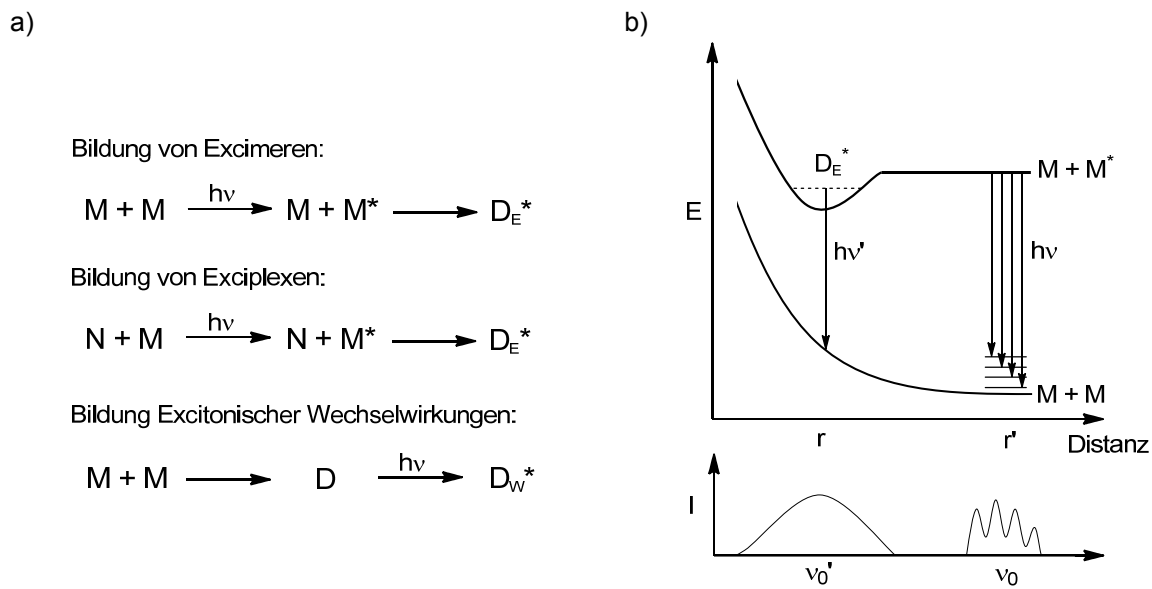


Abb. 11: a) Zustandekommen von Excimeren, Exciplexen und excitonischen Wechselwirkungen zwischen zwei Molekülen (M und N = Monomere, D = Dimere). Die gebildeten Dimere sind in ihrer photophysikalischen Natur nicht gleich. b) Energiediagramm der Excimerbildung und darunter das theoretische Emissionsspektrum bei Relaxation in den Grundzustand. (Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit.^[120]).

Wie auch bei den excitonischen Wechselwirkungen eignet sich DNA für die Ausbildung von Excimeren als Struktur gebendes Werkzeug. Dazu gibt es eine Vielzahl von Anwendungsbeispielen in denen Excimere aus Anthracen,^[121] Pyren^[111, 112, 122, 123] oder Perylen^[124] aufgebaut wurden. Darunter auch die Gruppe von *Wagenknecht*, die Perylenbisimid-modifizierte Oligomere zur Detektion von Einzelbasenpolymorphismen verwendeten.^[125] Hierbei ist eine sehr effiziente Excimer-Fluoreszenz nur bei den mutierten Basen zu sehen. Bei korrekter Basenpaarung ist keine Excimer Bildung möglich und es liegt zum größten Teil Monomer-Emission vor.

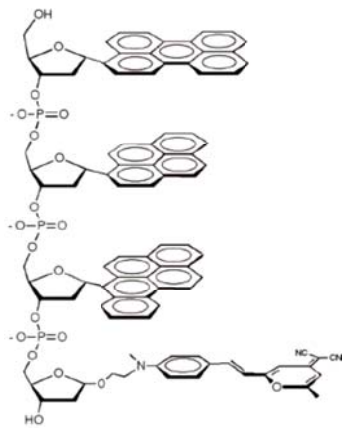


Abb. 12: Polyfluorophor-Oligomere von Kool et al. (Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit.^[126] Copyright American Chemical Society 2009).

Ein besonders eindrucksvolles Beispiel intermolekularer Wechselwirkungen stammt von *Eric Kool*, der mehrere kleine Chromophore hintereinander in Oligomeren kombinierte.^[126-129] Diese als Polyfluorophore bezeichneten DNA-Konstrukte vereinen dadurch alle denkbaren Energietransfermechanismen wie FRET, Excimere, Exciplexe, H-Aggregate und andere in einem System. Durch die multiple Anzahl an photo-physikalischen Prozessen und die kombinatorische Variation der einzelnen Chromophore erhielten sie eine Vielzahl funktioneller DNA-Sonden mit einer großen

Bandbreite an optischen Eigenschaften. *Kool et al.* konnten bereits zeigen, dass sich diese Sonden zur multiplen Färbung von Zebrafischen und deren Embryos^[126] sowie zur Detektion von Esterasen und Lipasen eignen.^[130]

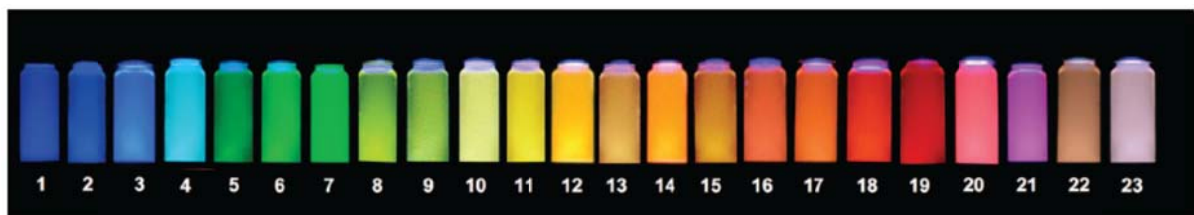


Abb. 13: Polyfluorophor-Oligomere von Kool et al. Durch Kombination von nur vier unterschiedlichen Chromophoren lässt sich ein ganzes Spektrum an Sonden unterschiedlichster Fluoreszenz bilden ($\lambda_{exc} = 354 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 376 - 629 \text{ nm}$; $\Phi_F = 4 - 90\%$). Verantwortlich dafür ist die Kombination unterschiedlicher Energietransfer-Prozesse wie FRET, Excimere, Exciplexe und H-Aggregate in einem System. (Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit.^[126] Copyright American Chemical Society 2009).

3.4 DNA-Nanopartikel

3.4.1 Nanopartikel und ihre Anwendungen

So modern der Begriff „Nanotechnologie“ auch klingt, Nanomaterialien kommen schon seit langer Zeit zum Einsatz. Bereits in der Antike wurden römische Glaspokale mit kolloidalen Goldpartikeln rötlich gefärbt.^[131] Seit dem Mittelalter werden die roten Töne in Kirchenfenstern durch Goldnanopartikel erzeugt. Die Farbigkeit ist dabei von der Partikelgröße abhängig und beruht auf einem Oberflächenplasmon-Effekt. Durch neue Methoden und moderne Technik hat sich die Nanotechnologie in den letzten Jahrzehnten rasant weiterentwickelt und bietet heute ein großes Repertoire an Materialien. Manche haben schon seit Jahren den Einzug in die Alltagswelt geschafft, wie TiO_2 oder ZnO Nanopartikel (30 – 80 nm) in Sonnencremes.^[132] Nano ist aber auch ein wichtiges Konzept der Natur. Sie steckt voller Nanoteilchen. Milch beispielsweise ist nur deshalb weiß, weil sie zu einem großen Teil aus Wasser besteht, in dem Fettpartikel emulgiert sind, die Durchmesser von 200 nm aufweisen und das Licht streuen. Dass sie aber nicht einfach als Fettklumpen sedimentieren, ist ein typischer Effekt von Nanoteilchen.

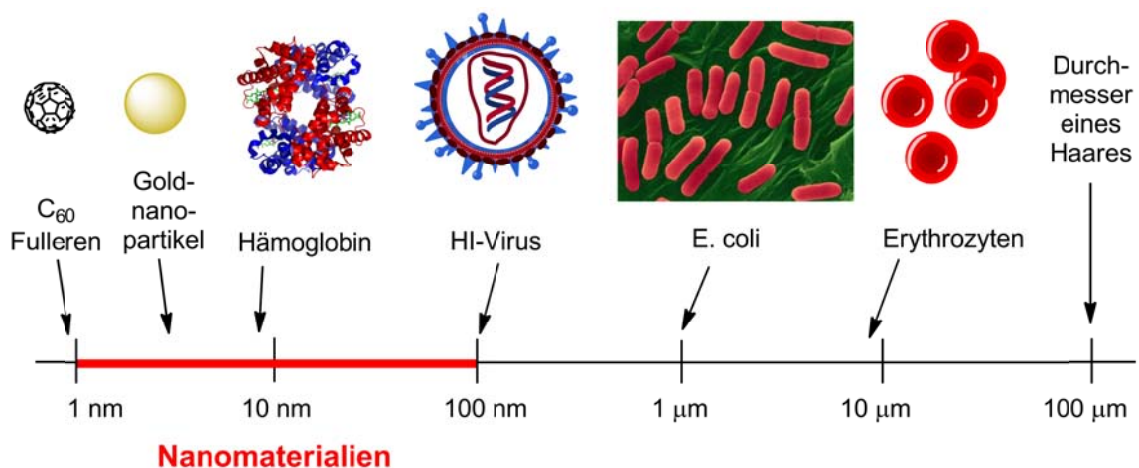


Abb. 14: Größenskala zur Einordnung von Nanomaterialien (Abb. in veränderter Form nach *Feldmann et al.* aus Lit.^[132]).

Allgemein werden als Nanopartikel (NPs) Stoffe bezeichnet, die ein abgeschlossenes Konstrukt bilden, das einen Durchmesser zwischen einem und 100 nm hat (ISO/TS

27687 vom August 2008). Wenn man bedenkt, dass 1 Nanometer der millionste Teil eines Millimeters ist, so bekommt man eine ungefähre Ahnung, in welcher Größenebene man sich bewegt (s. **Abb. 14**). Genau das macht Nanopartikel so interessant. Durch ihr Verhältnis zwischen Oberfläche und Größe sind Nanoteilchen sehr reaktionsfähig und zeigen meist komplett andere Eigenschaften als dasselbe Material im makroskopischen Maßstab. Sie können als Aggregate oder als einzelne, monodisperse Partikel vorliegen und dabei die unterschiedlichsten chemischen, physikalischen oder biologischen Funktionen aufweisen. Neben den bereits erwähnten Gold, TiO_2 und ZnO Nanopartikeln gibt es eine Reihe weiterer künstlich erzeugter Vertreter: Silber-Nanopartikel, SWNT bzw. MWNTS (*Single* bzw. *Multi-Walled Carbon Nanotubes*), Quantenpunkte (CdSe , CdTe), magnetische Nanopartikel (Fe_3O_4), CdS oder Upconversion Nanopartikel. Neben diesen anorganisch geprägten Nanopartikeln gibt es eine ganze Reihe sog. weicher Nanoteilchen, die oft aus selbstassemblierten bioorganischen oder organischen Bausteinen wie z. B. Lipiden aufgebaut sind.^[133, 134] Sie sind vor allem für ihre bessere Biokompatibilität bekannt.

Die Nanotechnologie bietet ein enormes Potential für die moderne Forschung und neuartige Anwendungen. So werden Nanopartikel bereits in der Medizin als Wirkstofftransporter, nichtvirale Vektoren oder als antimikrobielle Oberflächenbeschichtungen eingesetzt.^[135-137] Ein besonders spannendes Beispiel auf diesem Gebiet ist die hyperthermische Tumorbehandlung mit magnetischen Nanopartikeln.^[138, 139] Dabei werden magnetische Nanopartikel in die Nähe des Tumors injiziert, selektiv aufgenommen und durch ein Magnetfeld induktiv erhitzt. Dadurch werden lokal die Tumorzellen zerstört. Auch in großtechnischen Anlagen zur Gewinnung erneuerbarer Energien, Schadstoffumsetzung oder Wasseraufbereitung spielen Nanoteilchen eine vielversprechende Rolle. Für bioanalytische Anwendungen sind vor allem fluoreszierende Nanomaterialien von Interesse. Die interessantesten Vertreter sind dabei Quantenpunkte und Upconversion-Nanopartikel.

3.4.2 Upconversion Nanopartikel



Abb. 15: Upconversion Materialien zeigen sichtbare Fluoreszenz bei Anregung im energiearmen IR. (Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit.^[140] Copyright Wiley-VCH 2004).

Typischerweise werden Upconversion-Materialien im NIR oder IR angeregt und emittieren bei niedrigerer Wellenlänge, also höherer Energie, meist im sichtbaren Spektralbereich. Daher spricht man auch von anti-Stokes Prozessen. Dieses Phänomen nichtlinearer, optischer Prozesse beruht auf einer sequenziellen Absorption zweier- oder mehrerer Photonen. Dabei bilden sich langlebige, metastabile Energiezustände aus, die für den Effekt von grundlegender Bedeutung sind. Dieses Konzept wurde in den 1960er Jahren erstmals von *Auzel*, *Ovasyankin* und *Feofilov* entdeckt und wissenschaftlich beschrieben.^[141, 142] Die effizientesten Upconversion Materialien bestehen heute aus anorganischen Festkörpern, die meist mit Metallen der seltenen Erden wie trivalenten Lanthanoiden dotiert sind. Diese erfüllen die wichtigsten Voraussetzungen für UC-Prozesse: Langlebige angeregte Zustände, ähnliche Energiedifferenzen und gestaffelte Energiezustände.^[143] Mit einer besonders hohen Effizienz stechen dabei NaYF₄ Gitter hervor, die mit Er³⁺ und Yb³⁺ dotiert sind. Der UC-Prozess kann dabei durch drei Mechanismen beschrieben werden (s. **Abb. 16**): Absorption des angeregten Zustandes (*ESA*, *Excited State Absorption*), Energietransfer-Aufwärtskonversion (*ETU*, *Energy Transfer Upconversion*) und der Photonenlawine (*PA*, *Photon Avalanche*).^[141, 143-145]

Nach dem ESA-Prinzip wird ein Elektron durch geeignete Wellenlänge in einen angeregten Zustand überführt. Durch ein weiteres Photon kann es aus diesem metastabilen Zustand in einen höheren Zustand angeregt werden. Eine Emission aus diesem Zustand resultiert in typischer UC-Fluoreszenz. Es findet also eine sequenzielle zwei-Photonen-Absorption eines einzigen Ions statt.^[141, 143, 144]

Der ETU-Mechanismus basiert auf einem Energietransfer zweier benachbarter Ionen. Das eine Ion agiert dabei als Sensibilisator (Energie Donor) das andere als Aktivator (Energie Akzeptor). Es gibt mehrere Möglichkeiten wie hier der höchste Energiezustand (E2) erreicht wird.^[142] In jedem Fall ist aber die Absorption eines

Photons mit einem Resonanzenergietransfer auf das benachbarte Ion verknüpft, das sich ebenfalls in einem E1-Zustand befindet. Dadurch wird das Aktivator-Ion in den E2-Zustand angeregt und das Sensibilisator-Ion relaxiert strahlungslos in den Grundzustand. Die Emission aus dem höheren E2-Zustand liefert wieder die energiereiche UC-Fluoreszenz. Es wird deutlich, dass der Wechselwirkung zwischen den Seltenen-Erd-Ionen eine Schlüsselrolle zukommt. Die logische Konsequenz daraus ist, dass sich die Effizienz und Energetik dieses UC-Prozesses durch die Konzentration an dotierten Ionen steuern lässt.^[144]

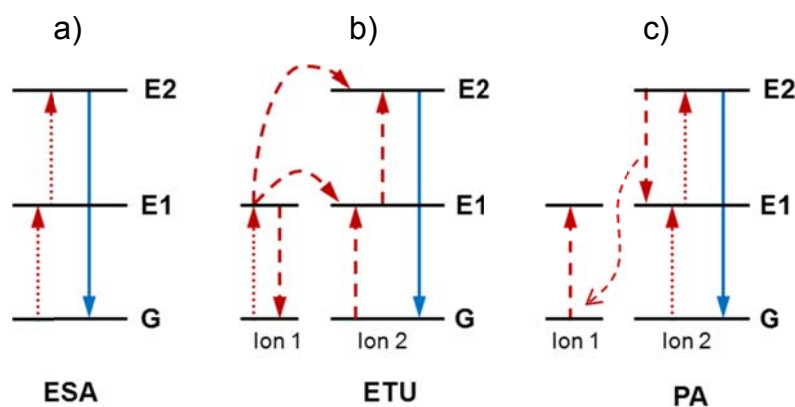


Abb. 16: Vereinfachte Energieniveauschemata der drei wichtigsten Mechanismen zur Erklärung des Upconversion-Prozesses: a) *Excited State Absorption*, b) *Energy Transfer Upconversion*, c) *Photon Avalanche*. Die gepunkteten Pfeile stehen für Photonenabsorption, die gestrichelten für Energietransfer, die durchgezogenen für Lichtemission (G = Grundzustand; E = Angeregte Zustände). Grafik in geänderter Form nach Wang und Liu aus Lit.^[141]

Der PA-Mechanismus, als dritter Mechanismus, setzt eine bestimmte Pumpintensität voraus. Der Prozess beginnt mit der Population des ersten angeregten Zustandes durch eine schwache, nicht-resonante Aktivierung. Unmittelbar darauf folgt ein Resonanzenergietransfer des ersten angeregten Zustandes in den höheren E2-Zustand. Dieser Zustand wird durch Energietransfer (*cross-relaxation*) auf ein benachbartes Ion im Grundzustand abgebaut. Daraus resultieren zwei Ionen, die sich jetzt jeweils im E1-Zustand befinden. Beide können nun wieder leicht in den E2-Zustand angeregt werden, aus dem sie wieder durch Energietransfer auf benachbarte Ionen im Grundzustand relaxieren, was sich lawinenartig (PA, *Photon Avalanche*) fortsetzt.^[141, 143, 144]

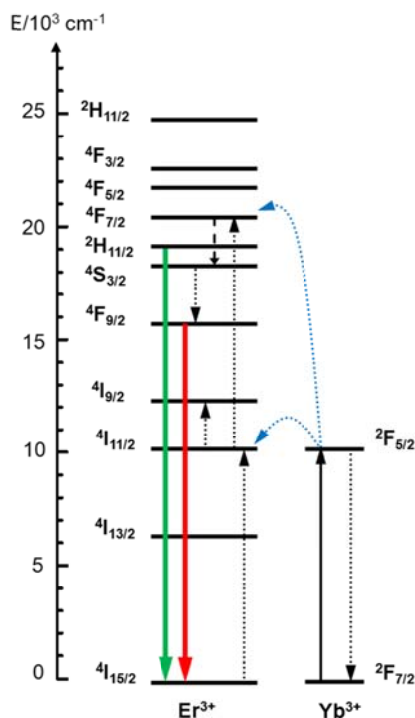


Abb. 17: Energieniveaudiagramm für einen Upconversion-Prozess zwischen Erbium und Ytterbium mit der typischen grünen (520 nm) und roten (655 nm) Emission bei Anregung mit 980 nm. Nach dem ETU-Modell erreicht Er^{3+} den hohen Energiezustand $4F_{7/2}$ sequenziell in zwei Schritten. Durch mehrere strahlungslose Relaxationsprozesse werden der $2H_{11/2}$ und der $4F_{9/2}$ -Zustand erreicht. Die Relaxation aus diesen beiden Zuständen liefert die typische UC-Fluoreszenz. Der Prozess ist dabei abhängig von der Besetzung und Lebensdauer des $4I_{11/2}$ -Zustandes. Die gepunkteten Linien stehen für Energietransferprozesse, die gestrichelten für Photonenrelaxation, durchgezogene Pfeile stehen für Lichtabsorption oder Emission.^[143] (Grafik nach Vorbild von Haase und Schäfer^[143]).

Der effektivste Prozess ist der ETU-Mechanismus. Er ist relativ unabhängig von der Anregungsenergie und liefert eine hundert Mal höhere UC-Emission als z.B. der PA-Prozess. Daher werden heute die meisten Upconversion Materialien auf dieser Basis hergestellt. Auch in dieser Arbeit wurden Upconversion Nanopartikel verwendet, die durch ihre Dotierung mit Yb^{3+} und Er^{3+} einem ETU-Mechanismus folgen. Dabei spielt, wie bereits erwähnt, das Konzentrationsverhältnis der Ionen eine wichtige Rolle, weil hierüber das Emissionsverhalten geregelt werden kann. Als Wirtgitter haben sich Fluoridverbindungen durchgesetzt, da in ihnen besonders lange Lebenszeiten der angeregten Zustände beobachtet wurden.^[143] Zusammen mit Na^+ und Y^{3+} , die zu einem defektfreien Gitteraufbau beitragen, ergeben sich z.B. hexagonale $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ oder Tm^{3+} Partikel. Daneben sind auch UC-Materialien anderer Morphologie wie Stäbchen, kubische Partikel, Röhren oder andere bekannt.^[141] In **Abb. 17** ist das Zustandekommen der beiden typischen Emissionsbande von Erbium nach dem ETU-Mechanismus dargestellt. Neben der Zusammensetzung der Lanthaniden spielt auch die Größe von UCNPs eine wichtige Rolle. Allgemein emittieren große UCNPs stärker als kleine.^[146] Was macht UCNPs nun so interessant? UCNPs zeigen einzigartige optische Eigenschaften. Die Emission im sichtbaren Bereich bei gleichzeitiger Anregung im IR-Bereich macht sie besonders

interessant für nahezu alle Arten fluoreszenter Bioanalytik.^[144, 147, 148] Zum einen ermöglicht IR-Licht ein tiefes Eindringen in biologisches Material, was besonders bei in vitro Anwendung wichtig ist.^[149] Zum anderen entsteht bei dieser Anregungswellenlänge keinerlei Autofluoreszenz, da biologisches Material hier nicht absorbiert und somit auch nicht zusätzlich geschädigt wird. Einer der größten Vorteile im Vergleich zu organischen Chromophoren liegt darin, dass UCNPs quasi nicht ausbleichen. Selbst bei intensiver Laserbestrahlung über Wochen konnte kein Effizienzverlust beobachtet werden.^[150] Zudem sind UCNPs, nach bisherigem Kenntnisstand, nur gering toxisch (vgl. 3.4.4). Einziger Nachteil: Die Quantenausbeuten sind bisher mit 0,3 % noch nicht sehr hoch,^[151] wobei hier noch genügend Spielraum zur Verbesserung vorhanden ist. Zum Vergleich: Quantenpunkte erreichen Werte von 5 - 85 %.^[150]

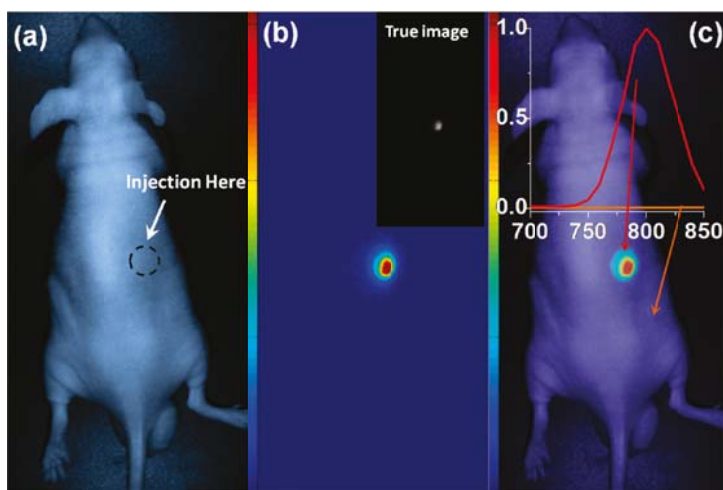


Abb. 18: Beispiel für eine Anwendung von Upconversion-Nanopartikeln in vivo. Durch die Anregung im IR bei 980 nm kann das Anregungslicht tief in ein biologisches System eindringen, ohne Hintergrund-strahlung und ohne Gewebe zu schädigen. Die Fluoreszenz ist deutlich am Ort der Injektion zu sehen (Wiedergabe mit Ge-nehmigung aus Lit.^[149], Copyright American Chemical Society 2011) .

Besonders in den letzten zehn Jahren hat sich die Upconversion-Technologie rasant weiterentwickelt, was sich in einer Vielzahl von interessanten Arbeiten ablesen lässt. Die folgende Tabelle soll einen repräsentativen Überblick unterschiedlicher Anwendungen geben.

Tabelle 4: Übersicht einiger herausragender Anwendungen von UC-Material aus unterschiedlichen Bereichen.

Lit.	Anwendung
[152]	Gezielte Freisetzung von siRNA in Krebszellen bei fluoreszenter Bildgebung. Konjugate aus UCNPs, siRNA und zielspezifischen Antikörpern.
[153]	Detektion von Nukleinsäuren in einem DNA-Microarray mit Hilfe biotinylierter UC-Materialien mit sehr hoher Sensitivität.
[154, 155]	Oligonukleotid Sensor für Punktmutationen die bei der Erkrankung an Sichelzellanämie eine Rolle spielen. FRET-System aus UCNPs und TAMRA.
[156]	UCNPs für nanoskalige Thermometrie. Intrazelluläre Temperaturbestimmung über transfizierte UCNPs in unterschiedlichen Zelltypen.
[157]	Echtzeit Verfolgung von UCNPs in lebenden Zellen über lange Zeiträume.
[149, 158, 159]	Anwendung von UCNPs im Tiermodell oder Würmern. Fluoreszenzsignale aus tiefen Schichten biologischen Materials. Vergleich mit Quantenpunkten.
[160]	FRET zwischen DNA funktionalisierten UPCONs und Graphenoxid als Sensor-Plattform mit beeindruckender Effizienz der Fluoreszenzlöschung.
[161]	Detektion der DNA Freisetzung von UCNPs in lebenden Zellen über ein LRET- System (Lumineszenzresonanz Energietransfer) und Schutz von DNA an UCNP-Oberfläche vor DNase1.

3.4.3 Verknüpfung von DNA mit Nanopartikeln

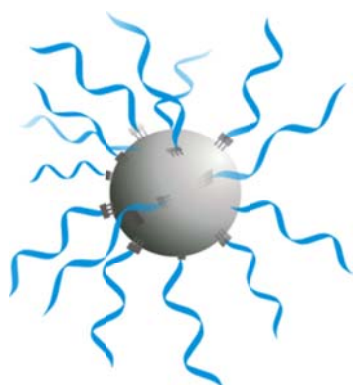


Abb. 19: Illustration DNA-funktionalisierter Nanopartikel.

Die Kombination von DNA mit Nanopartikeln verbindet die jeweils spezifischen Eigenschaften beider Materialien. Dadurch wird das Anwendungsspektrum von Nanopartikeln enorm erweitert, was vor allem für den Einsatz in der Bioanalytik und der Nanomedizin neuartige Möglichkeiten und Ansatzpunkte schafft. Die DNA auf der einen Seite ermöglicht eine molekulare Erkennung, verbessert die Wasserlöslichkeit und Biokompatibilität.^[162, 163] Die Nanopartikel auf der

anderen Seite dienen als nichtviraler Vektor, vor allem für den Einsatz von DNA/RNA als Wirkstoff,^[137] und bringen zusätzlich die jeweils materialspezifischen „Nano“-Eigenschaften (z. B. Fluoreszenz) mit.

Prinzipiell können Nukleinsäuren kovalent oder über unterschiedliche nicht-kovalente Wechselwirkungen auf Nanopartikeln immobilisiert werden. Da es sich bei Nanopartikeln grundsätzlich um Feststoffe handelt, können etablierte Verknüpfungsmethoden aus der Oberflächen-Chemie eingesetzt werden. So werden häufig streptavidinmodifizierte Nanopartikel mit biotinylierter DNA verbunden. Der Nachteil dieser Methode ist der hohe Raumanspruch des Proteins Streptavidin (60.000 Da) und unspezifische Wechselwirkungen. Für eine kovalente Verknüpfung wird häufig eine Kupplung aus Nanopartikeln mit epoxidierten Oberflächen und amin-modifizierten (Aminalkyl-Linker) DNA-Strängen durchgeführt. Aminmodifizierte Oligomere können auch über Amidbindung an carboxylierte Nanopartikel, oder umgekehrt, geknüpft werden.^[163] Vor allem bei Gold-Nanopartikeln haben sich Kopplungen mit Schwefelverbindungen etabliert, da diese besonders gut an Gold koordinieren. Typischerweise werden Thiol-, Disulfid- oder Phosphin-Liganden als Ankergruppen verwendet, die entweder eine zweite funktionelle Gruppe tragen oder direkt mit der DNA verbunden sind.^[164] Derart modifizierte Nukleinsäuren können einfach über die DNA-Fetphasensynthese z. B. mit terminalen Alkylthiolen synthetisiert und danach direkt verknüpft werden. Diese Methode kann auch bei Quantenpunkten verwendet werden. Durch den anorganischen Charakter mancher Nanomaterialien kann DNA aber auch rein durch attraktive Wechselwirkungen auf die NP-Oberfläche adsorbiert werden. Beispiele hierfür sind Verknüpfungen über hydrophobe Wechselwirkungen von DNA mit Graphen-Nanoröhren oder über ionische Wechselwirkungen mit Cd^{2+} in Quantenpunkten.^[164-167]

DNA-funktionalisierte Upconversion-Nanopartikel

Upconversion-Materialien verfügen selbst über keine funktionellen Gruppen für die Biokonjugation. Daher werden sie meist mit Silica-Hüllen umgeben, die weitere funktionelle Gruppen enthalten können. Für Verknüpfungen von DNA mit Upconversion-Nanopartikeln sind allgemein nur wenige Beispiele bekannt, die sich insgesamt auf drei Techniken beschränken.

Peng Zhang et al. beschäftigen sich seit mehreren Jahren mit DNA-Sonden die aus einem FRET-System DNA-funktionalisierter UCNP's und Fluorophoren aufgebaut sind.^[155] Die Nukleinsäuren wurden dabei über aminmodifizierte Oligomere entweder durch Bromcyan an Alkohole der Silicahülle geknüpft^[168] oder mit EDC an carboxylmodifizierte Oberflächen s. **Abb. 20**).^[169]

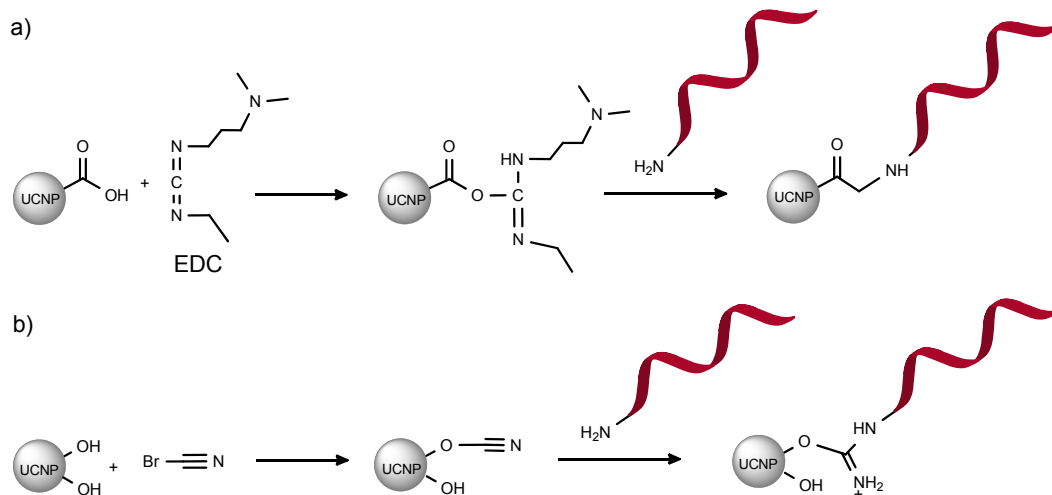


Abb. 20: Die bisher einzig bekannten kovalenten Verknüpfungsmethoden für DNA und UCNP's über aminfunktionalisierte Oligomere. **a)** Über die Aktivierung von Carbonylgruppen an der UCNP-Oberfläche mit EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid) kann die DNA im zweiten Schritt verknüpft werden. **b)** Variante der Aminkopplung, bei der Alkoholgruppen der Silica-Hülle von UCNP's mit Bromcyan aktiviert werden, und im zweiten Schritt mit der aminmodifizierten DNA zur Isoharnstoff-Verbindung reagieren.

Im Gegensatz dazu nutzen *Yong Zhang et al.* elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Upconversion Nanopartikeln und DNA oder RNA.^[152, 161] Dazu sind die Oberflächen der UCNP's Aminofunktionalisiert. In wässriger Pufferlösung sind diese positiv geladen und bilden somit elektrostatische Wechselwirkungen mit dem negativ geladenen Rückgrat der DNA aus. *Zhang et al.* konnten dabei beobachten, dass DNA bzw. RNA auf diese Weise bei der Transfektion vor Nukleasen geschützt werden.

Eine ganz klassische Verknüpfung wird von einer finnischen Forschungsgruppe um *Tero Soukka* verwendet. Sie knüpfen biotinylierte Oligomere an mit Streptavidin modifizierte UCNP's. Vor kurzem veröffentlichte die Gruppe ein Nachweisverfahren für DNA, bei dem in Mikrotiterplatten Oligomere mithilfe von

UCNPs in einer speziell entwickelten Apparatur detektiert werden können.^[170] Die spezielle Konstruktion ist notwendig, da konventionelle Lesegeräte für Mikrotiterplatten nicht für UC-Materialien konzipiert sind.

Es hat sich gezeigt, dass bereits einige Methoden erfolgreich für die DNA Verknüpfung eingesetzt werden. Trotzdem besteht ein großer Bedarf an neuartigen und alternativen Verknüpfungstechniken. Grundsätzlich sind besonders solche Methoden geeignet, die unter milden chemischen und wässrigen Bedingungen ablaufen, da dies das Arbeiten mit DNA voraussetzt. Methoden, die eine dichte, kovalente und definierte Oberflächenfunktionalisierung liefern, sind das Ziel neuartiger Ansätze. So soll im Rahmen dieser Arbeit die kupferkatalysierte Cycloaddition zwischen Alkinen und Aziden für die Verknüpfung von UCNPs mit DNA entwickelt und auf ihren Nutzen untersucht werden. Die Vorteile sind die Bioorthogonalität der Reaktion, milde Bedingungen, geringer Raumanspruch und die Möglichkeit der quantitativen Reaktionskontrolle mittels IR-Spektroskopie. Nach sorgfältiger Literaturrecherche ist diese Methode für UCNPs neuartig und wurde bisher noch nie veröffentlicht. Es gibt jedoch aktuelle Beispiele, bei denen andere Arten von Nanopartikeln durch Klick-Konjugation, teilweise auch mit DNA, funktionalisiert wurden: Magnetische Nanopartikel mit DNA,^[171] Goldnanopartikel mit Lipase,^[172] Silica-Nanopartikel mit DNA^[173] und Polymernanopartikel mit unterschiedlichen Molekülen.^[174, 175]

3.4.4 Cytotoxizität

„Riskante Zwerge“,^[176] „Kleine Teilchen, großes Risiko“^[177] oder „Rätsel um das Nano-Risiko“^[178] sind typische Schlagzeilen die in den letzten Jahren Einzug in die Alltagsmedien finden. Sie setzen sich mit dem Gefahrenpotential von Nanomaterialien auseinander, die zunehmend Einzug in Alltagsgegenstände und Substanzen finden. Die Sorge ist berechtigt. Nanoteilchen können aufgrund ihrer geringen Größe (< 100nm) über die Schleimhäute, Lunge oder Haut aufgenommen werden und in Zellen gelangen. Für eine ganze Reihe von Nanomaterialien konnte bereits ein hohes Maß an Cytotoxizität nachgewiesen werden. Für andere Nanopartikel konnte wiederum gezeigt werden, dass sie nicht als gefährdend einzustufen

sind, wie z. B. TiO_2 in Sonnencremes. Klar ist nur: Die Gefährlichkeit von Nanomaterialien folgt keiner allgemeinen Systematik. Zwar spielen Größe, Material usw. oft die entscheidende Rolle, letztendlich weißt aber jede Art von Nanopartikeln eine spezielle Toxizität auf. Dies erschwert es, Nanoteilchen allein nach ihren Substanzmerkmalen einzustufen. Es ist daher besonders wichtig, jegliche Art von Nanopartikeln auf ihr Gefährdungspotential hin zu untersuchen, beispielsweise mit Hilfe von Cytotoxizitäts-Assays. Die Zell- oder Cytotoxizität gibt grundlegende Hinweise auf das Gefährdungspotential des untersuchten Materials für Lebewesen. Die Ergebnisse können jedoch nicht ohne weiteres auf komplexe Organismen übertragen werden.

2008 erschien mit dem Titel „*Cytotoxicity of Nanoparticles*“ einer der umfangreichsten Übersichtartikel zu diesem Thema.^[179] Darin werden die gängigsten Arten von harten Nanopartikeln und deren wichtigste Zelltoxizitätsstudien zusammengefasst. Der Artikel beinhaltet folgende Materialien (teilweise auch mit funktionalisierten Oberflächen):

- Fullerene (bis 270 nm)
- SWNTs (*Single-Walled Carbon Nanotubes*)
- MWNTs (*Multi-Walled Carbon Nanotubes*)
- Gold Nanopartikel
- Gold Nanohüllen (*Gold Nanoshells*)
- Gold Nanostäbchen (*Gold Nanorods*)
- magnetische Nanopartikel (Fe_3O_4)
- Quantenpunkte (CdSe und CdTe)

Als Resümee lassen sich einige wichtige Punkte und Gemeinsamkeiten zusammenfassen: Die Dosis und Einwirkzeit spielt bei allen untersuchten Nanopartikeln eine entscheidende Rolle. So fanden alle Forschungsgruppen cytotoxische Effekte bei höheren Konzentrationen, die in einer Zeit- und Dosisabhängigen Weise auftraten. Generell überstehen Zellen eine kurzzeitige Konfrontation mit Nanopartikelkonzentrationen von weniger als 10 $\mu\text{g/mL}$ unbeschadet. Ein zweiter gemeinsamer Punkt ist die Abhängigkeit der Cytotoxizität von der Oberflächenladung der jeweiligen

Partikel.^[180] Solche mit positiver Ladung sind toxischer als anionische.^[181] Der Grund für diesen Unterschied liegt in attraktiven Wechselwirkungen von kationischen Partikeln mit der negativ geladenen Zelloberfläche und der dadurch verbesserten Aufnahme. Neutrale Nanopartikel zeigen allgemein die höchste Biokompatibilität. Die geringste Cytotoxizität aller dieser Materialein zeigen Gold-Nanopartikel. Aber auch hier konnten bei Konzentrationen höher als 200 µg/mL toxische Effekte beobachtet werden. Bei allen Nanopartikeln konnte beobachtet werden, dass die Zellaufnahme mit der Cytotoxizität korreliert, das heißt, je mehr Partikel in den Intrazellulärraum aufgenommen werden, desto toxischer sind sie.

Diese Gemeinsamkeiten ermöglichen ein besseres Verständnis der Zusammenhänge zwischen Stoffeigenschaften und Cytotoxizität. Dabei müssen aber auch die Schwachstellen der bisherigen Untersuchungen erwähnt werden. Zum einen lassen sich die Ergebnisse aus den *in vitro* Untersuchungen nicht einfach auf *in vivo* Anwendungen übertragen. Dazu fehlen Langzeitstudien, die genomische Effekte oder wiederholende Expositionen berücksichtigen. Dieser Punkt ist im Hinblick auf die schnelle Entwicklung der Nanomedizin besonders wichtig.^[135] Ein weiterer kritischer Punkt ist, dass bisher keine standardisierten Testmethoden angewandt werden, die einen transparenten Vergleich zulassen.

In Abgrenzung zu den bisher vorgestellten, anorganisch geprägten Nanopartikeln gibt es weiche Nanopartikel, die ungefährlich sind und z. B. in Form von Liposompräparaten bereits auf dem Markt erhältlich sind.^[133] Polymilchsäurepartikel z. B. liefern nichttoxische Abbauprodukte, die über die Niere ausgeschieden werden.^[133]

Die Aufmerksamkeit für den Nutzen und die Risiken der Nanomaterialien ist sowohl in der Gesellschaft als auch in der Wissenschaft sehr hoch, was aufgrund des enormen Anwendungspotentials der Nanotechnologie besonders wichtig ist. Es scheint eine frühe, sachlich fundierte und kritische Auseinandersetzung mit diesen neuartigen Substanzen stattzufinden, was sicherlich zielführender ist als polemische Diskussionen. „Eine Bagatellisierung von Risiken ist ebenso wenig hilfreich wie deren Dramatisierung, insbesondere solange keine fundierten Daten vorliegen“ schreibt Claus Feldmann sehr treffend in einem Übersichtsartikel zu funktionellen Nanopartikeln.^[132]

Fazit: Es ist unerlässlich für ein effektives Risikomanagement, jede neue Art von Nanopartikeln experimentell und durch fundierte Kenntnisse auf deren toxisches Potential zu prüfen und validieren. So wurden auch die in dieser Arbeit entwickelten DNA-funktionalisierten UCNPs auf ihre Cytotoxizität untersucht, was überraschende Ergebnisse hervorbrachte (s. Kapitel 8.3).

4 Entwicklung von DNA-Sonden mit CyIQ

Ziel von Fluorophor-DNA-Sonden ist, durch Farbwechsel, Fluoreszenzlöschung oder Intensitätsänderungen bestimmte biologische Strukturen oder die Anwesenheit von Ziel-DNA anzuzeigen. Für diese Art von Anwendungen erscheint der CyIQ-Farbstoff (*Cyanine Indole Quinoline*), dessen Grundstruktur bereits von *Young-Tae Chang* veröffentlicht wurde,^[35, 36] gut geeignet. Der Fluorophor besteht aus einem auxochromen (Indol) und einem antiauxochromen (Chinolin) Teil, der durch eine kurze Polymethinbrücke verbunden ist.

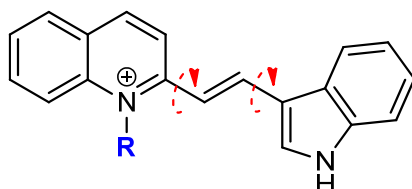


Abb. 21: Grundgerüst des CyIQ-Chromophors bestehend aus einem Chinolin- und einem Indol-Teil, der über eine kurze Polymethinbrücke verknüpft ist.

Die grundlegende Idee bei der Entwicklung von CyIQ-DNA war es, den Farbstoff postsynthetisch eng an die DNA zu koppeln. Die räumliche Nähe soll dabei eine möglichst effektive DNA-Fluorophor bzw. Fluorophor-Fluorophor Wechselwirkung ermöglichen, welche die Ausbildung excitonischer Wechselwirkungen unterstützen soll. Die postsynthetische Kupplung folgt dem Ziel, Chromophore schnell und ohne synthetischen Aufwand nachträglich an jede beliebige Stelle der DNA knüpfen zu können. Hierfür erscheint die Kupfer-(I)-katalysierte „Klick“-Konjugation eines Azids mit einem Alkin nach *Huisgen*,^[49, 50] *Sharpless*,^[51, 182] und *Meldal*^[52] besonders geeignet, da sie bioorthogonal und unter milden wässrigen Bedingungen verläuft. Dieser Ansatz gewinnt in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung^[45, 54] und wird auch an der Universität Regensburg u. a. von *Wagenknecht*^[73] und *Wolfbeis*^[61, 183] erfolgreich umgesetzt.

In dieser Arbeit wird der Chromophor mit einem Alkyl-Azid-Linker modifiziert, der das π -System des Farbstoffs nicht stört und ihn gleichzeitig flexibel hält. Das entsprechende terminale Alkin wird über ein literaturbekanntes^[184] und in der

Arbeitsgruppe bereits etabliertes 2'-*O*-Propargyl-Uridin in die DNA eingebaut. Dadurch bleibt die Basenpaarung und Stapelung der DNA erhalten.^[184] Dieses Kapitel soll den systematischen Aufbau von CylQ-DNA-Sonden darstellen. Synthese und Einbau in DNA bilden zu Beginn die Grundlage für alle weiteren Schritte. Die anschließenden Untersuchungen der optischen Eigenschaften geben die Richtung für die gezielte Weiterentwicklung des DNA-Chromophor-Systems vor. Erste bioanalytische Anwendungsbeispiele sollen den Nutzen und das Potential dieses maßgeschneiderten Systems unterstreichen.

4.1 Synthese und Klick-Konjugation

4.1.1 Synthese des Cyanin Farbstoffs CylQ

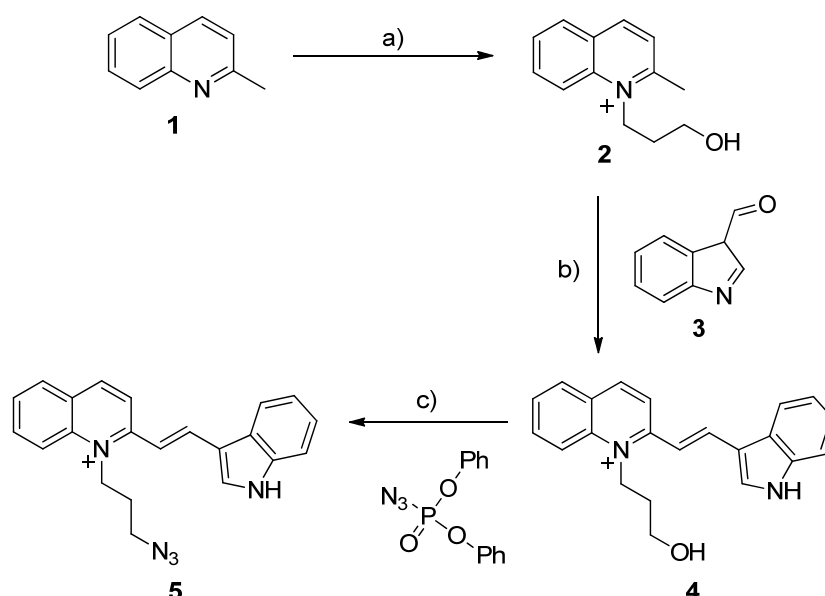


Abb. 22: Syntheschema des azidmodifizierten CylQ-Chromophors. a) 1-Iod-3-Propanol, Dioxan, 60 °C, 96 h, 52 %, b) Piperidin, EtOH, 24 h Rückfluss 87 %, c) Diphenylphosphinyl Azid, Ph₃P, DIAD, MeCN, 24 h, RT, 24h, 50 °C, 18 %.

Für den postsynthetischen, kovalenten Einbau in DNA wurde eine Synthesestrategie erarbeitet, die eine Verknüpfung am Chinolin-Stickstoff des Farbstoffs vorsieht. Dazu wird zu Beginn 2-Methylchinolin (**1**) mit 1-Iodpropanol alkyliert und man erhält **2**. Um den primären Alkohol in ein Azid umzuwandeln, stellte sich die Frage, ob nicht

Halogene als bessere Abgangsgruppe zu bevorzugen sind. Versuche, das 2-Methylchinolin (**1**) mit 1-3-Diodpropan zu alkylieren, führten jedoch zu falschen Produkten. Des Weiteren muss bei dieser Stufe darauf geachtet werden, frisch hergestelltes 1-Iodpropanol zu verwenden, welches man aus einer Finkelstein-Reaktion mit 1-Chlorpropanol und Natriumiodid erhält. Wurde älteres Iodpropanol verwendet, so verlief die Reaktion mit schlechten Ausbeuten oder fand überhaupt nicht statt. In der zweiten Stufe wird **2** in basischer Umgebung mit 1*H*-Indol-3-carbaldehyd (**3**) in einer Kondensationsreaktion zum Chromophor **4** verknüpft. Dieser imponiert bereits durch eine kräftig dunkelrote Farbe. Für die Azidierung in der letzten Stufe wurden zunächst klassische Ansätze wie der Azid-Halogen-Austausch oder die Substitution guter Abgangsgruppen wie Mesyl- oder Tosyl-Gruppen verfolgt. Keiner dieser Ansätze lieferte brauchbare Ergebnisse. Daher wurde eine *Mitsunobu*-Reaktion^[185] mit Diphenylphosphoryl-Azid^[186] (DPPA) und Diisopropylazodicarboxylat durchgeführt. Diese Reaktion ermöglicht eine direkte Umsetzung primärer und sekundärer Alkohole nach einem S_N2-Mechanismus zu Aziden, was auch in dieser Arbeit gelang und das Endprodukt **5** lieferte. Da das eingesetzte DPPA bei der späteren Cycloaddition ebenfalls reagieren würde, musste **5** in hochgereinigtem Zustand vorliegen, was schließlich durch präparative HPLC gelang.

Die Ausbeute an Farbstoff-Azid ist mit ca. 18 % nicht hoch, zeigt aber auf der anderen Seite die Überlegenheit gegenüber dem klassischen Einbau eines Farbstoffs via Phosphoramidit: 20 µM an Farbstoff-Azid reichen aus, um mindestens 20 DNA-Stränge zu markieren. Für die gleiche Anzahl DNA wäre mindestens die 10 fache Menge an Phosphoramidit-Farbstoff nötig, wobei hier von sehr gut einbauenden Molekülen ausgegangen wird. Mit dem CylQ-Azid ist es somit möglich, schnell und ohne größeren synthetischen Aufwand ein beliebiges Oligonukleotid zu modifizieren. Das entsprechende Alkin-Derivat wird als modifiziertes Nukleosid in die DNA eingebaut.

4.1.2 Synthese des 2'-O-Propargyl-Uridins

Der universelle Einbau eines Alkin-Bausteins an jede mögliche Position von Oligonukleotiden wird durch ein modifiziertes Uridin ermöglicht. Der Baustein wird während der DNA-Festphasensynthese unter Standardbedingungen eingesetzt. Da

die Acetylen-Gruppe an der 2'-Position der Ribose verknüpft ist, steht das Uracil weiterhin zur Basenpaarung bereit. Die natürliche DNA-Architektur sollte also möglichst ungestört vorliegen, was für bestimmte Anwendungen wie z.B. PCR von Bedeutung ist.^[75] Die Synthese dieses alkinmodifizierten Uridins wurde 1988 von *Grotli et al.* publiziert^[184, 187, 188] und konnte in der Arbeitsgruppe *Wagenknecht* erfolgreich eingesetzt werden.^[73, 189] Obwohl die Synthese weitestgehend den Literaturbedingungen folgt, wird hier kurz darauf eingegangen, denn der Baustein spielt für die gesamte Arbeit eine zentrale Rolle.

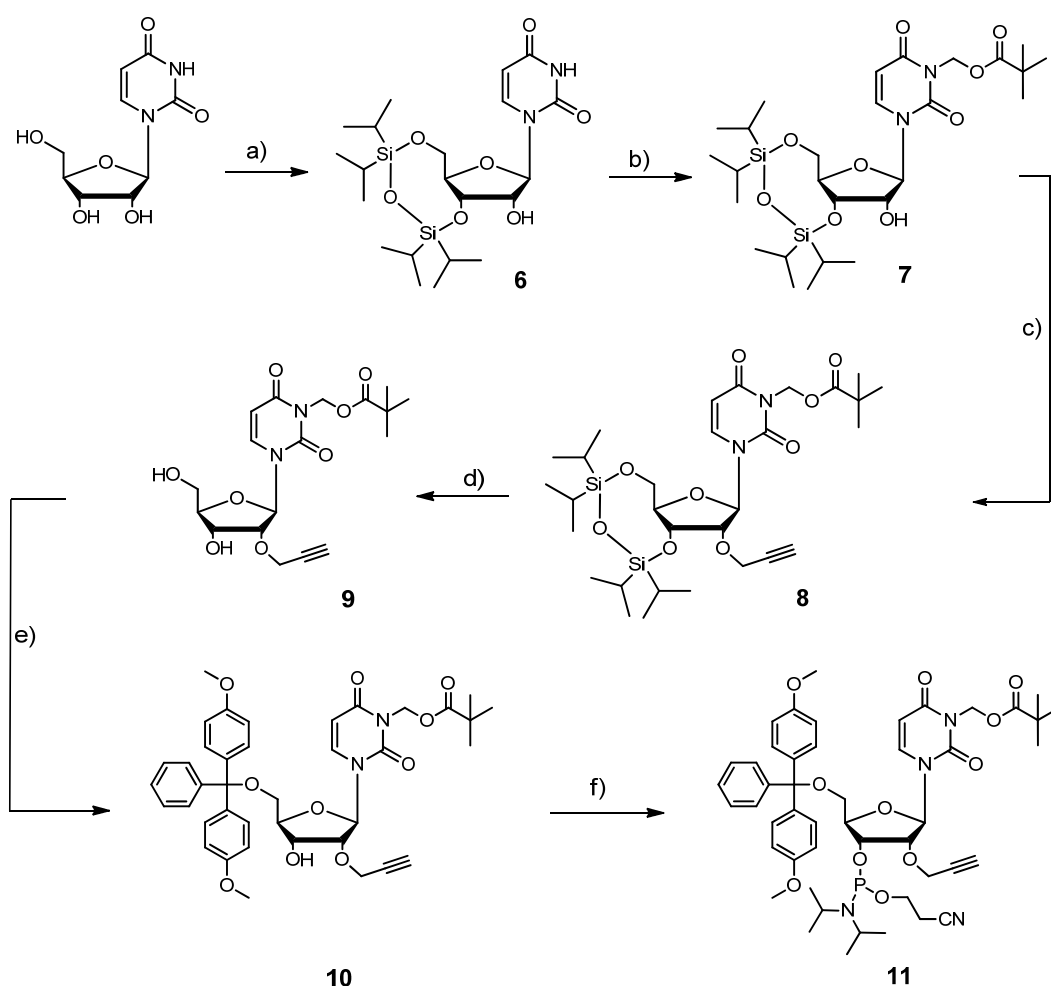


Abb. 23: Syntheschema zur Darstellung des 2'-O-Propargyl-Uridins 11, das in dieser Arbeit auch als Klick-Uridin (kU) bezeichnet wird. a) 1,3-Dichloro-1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxan, Pyridin, 6 h, RT, 78 %; b) Pivaloylmethylchlorid, TBAHS, CH₂Cl₂/ Na₂CO₃, 72 h, RT, 85 %; c) Propargylbromid, Phosphazenenbase P1-t-Bu, MeCN, 15 min. bei 0 °C, 90 min. bei RT, 39 %; d) Et₃N·(HF)₃, THF, 12 h, RT, 40 %; e) 4,4'-Dimethoxy-tritylchlorid, Pyridin, 16 h, RT, 84 %; f) 2-Cyanoethoxy-N,N-diisopropylchlorophosphoramidit, DIPEA, CH₂Cl₂, 3 h, RT, 91 %.

Ausgehend von kommerziellem Uridin wird in der ersten Stufe eine Schützung der 3'- und 5'-OH Gruppen des Uridins vorgenommen. Dafür verwendet man eine von *Markiewicz*^[190] entwickelte, zyklische Silylether-Schutzgruppe. Sie ist selektiv, lässt somit die 2'-OH Gruppe frei und zugänglich für das Anbringen des Alkins. Im nächsten Schritt wird die Aminfunktion des Uridins geschützt, was mit einer basenlabilen POM- (Pivaloyloxymethyl) Schutzgruppe geschieht. Sie wird erst am Ende der DNA-Synthese zusammen mit den exocyclischen Amin-Schutzgruppen der anderen Basen (A, T, G, C) abgespalten. Jetzt erfolgt die eigentliche Propargylierung an der 2'-Position des Zuckers, was mit Propargylbromid und der Phosphazene-Base P1-t-Bu geschieht. Anschließend können die 3'- und 5'- Position der Ribose wieder entschützt werden, am besten mit $\text{Et}_3\text{N}^*(\text{HF})_3$. Der Baustein wird jetzt noch für die automatisierte DNA-Festphasensynthese vorbereitet. Im ersten Schritt wird an die 5'-OH Gruppe der Ribose eine säurelabile DMT (4,4'-Dimethoxytrityl) Gruppe geknüpft. Nach Aufarbeitung erfolgt die Schützung der 3'-OH Gruppe unter Standardbedingungen mit 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchloro-phosphoramidit. Der Baustein wird abschließend über mind. 12 h im Hochvakuum getrocknet und kann anschließend als 0,1 M Lösung in Acetonitril im DNA-Synthesizer eingesetzt werden. Der Phosphoramidit-Baustein ist hydrolyse- und säurelabil. Er sollte daher zügig der DNA-Synthese zugeführt werden, oder im lyophilisierten Zustand unter Schutzgas bei – 30 °C aufbewahrt werden. Seit 2010 ist der 2'-O-Propargyl-Uridin-Baustein **9**, sowie die entsprechenden Derivate der übrigen Nukleoside A, T, G und C kommerziell erhältlich. Dies erleichterte und beschleunigte die Synthesen modifizierter DNA und verdeutlicht gleichzeitig das zunehmende Potential der Methode.

4.1.3 Synthese modifizierter Oligonukleotide

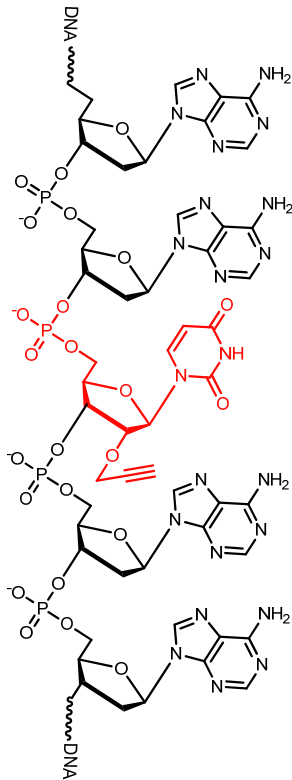


Abb. 24: Klick-Uridin (kU, 2'-O-Propargyl-Uridin) in DNA.

Der Einbau des 2'-O-Propargyl-Uridins erfolgt über die automatisierte DNA-Festphasensynthese nach der Phosphoramiditmethode von Letsinger^[191] und Caruthers.^[192] Die automatische Synthese von DNA ist trotz aller Routine eine der faszinierendsten Techniken unserer Zeit, wenn man sich vor Augen führt, dass sie es ermöglicht, binnen kürzester Zeit Oligonukleotide bis zu 200 Basen rein chemisch, ohne Einsatz von Enzymen zu synthetisieren. Der größte Vorteil der Methode ist sicherlich die Möglichkeit, artifizielle Bausteine in die DNA einzubringen. Hier stoßen biochemische Polymerase-Reaktionen an ihre Grenzen. So wurde auch im Rahmen dieser Arbeit der universelle Klick-Baustein an unterschiedliche Stellen der DNA eingebaut. Je nach Einsatz-gebiet erfolgte der Einbau dabei am 3'- oder am 5'-Ende (für Nanopartikel s. 7.1) der DNA sowie an unterschiedlichen Stellen innerhalb der Oligomere. Auch

Doppel- und Dreifacheinbauten wurden auf diese Weise

vorgenommen. Für CyIQ Dimer-Stränge wurden zwei Klick-Uridine direkt nacheinander eingebaut. Der Baustein wurde stets als 0,1 M Lösung in Acetonitril eingesetzt. Die Kupplungseffizienz während der Synthese ist dabei in allen Fällen genauso hoch wie bei den Standard DNA-Basen A, T, G und C. Für die Klick-Reaktion mit Nanopartikeln wurden die Stränge nach der Synthese und Abspaltung von fester Phase via HPLC vorgereinigt. Für die Klick-Reaktion mit CyIQ ist dies nicht notwendig, hier erfolgt erst vom fertigen Klick Konjugat eine HPLC Reinigung.

4.1.4 Klick-Konjugation mit CylQ

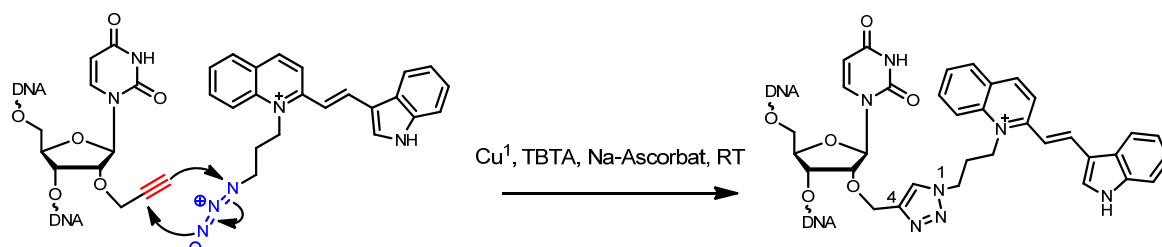


Abb. 25: Die kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition von CylQ mit 2'-O-Propargyl-Uridin in DNA unter Bildung eines 1,4-disubstituierten 1,2,3-Triazols.

„The solution of one problem usually generates a bevy of new ones“ schreibt *Rolf Huisgen* 1994 in seiner Autobiografie.^[27] *Huisgen* klärte in den 1950er und 60er Jahren den Mechanismus der 1,3-dipolaren Cycloaddition von Aziden mit Alkinen auf und gilt als Urvater der „Klick-Chemie“.^[49, 50] Sein Zitat beschreibt in treffender Art und Weise die Probleme der Reaktion auf ihrem Weg zur DNA-Anwendung. Zunächst stellt diese Art von Cycloaddition für die DNA-Chemie eine höchst interessante Verknüpfungsmöglichkeit dar, da die Reaktion bioorthogonal verläuft. Die klassische Reaktion benötigt jedoch hohe Temperaturen und organische Lösungsmittel, was in biologischen Systemen in der Regel nicht umsetzbar ist. 2002 entdeckten *Meldal*^[52] und *Sharpless*^[51] jedoch, dass die Reaktion durch Kupfer(I) katalysiert werden kann und dadurch nicht nur schneller abläuft sondern auch regioselektiv 1,4-disubstituierte Triazole liefert. Das Problem der harschen Reaktionsbedingungen war also gelöst, erzeugte jedoch zugleich ein neues: Kupfer Ionen können DNA oxidativ schädigen und Strangbrüche erzeugen.^[193-195] Dies verzögerte den Einsatz der kupferkatalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) in DNA erneut.^[45] *Sharpless* konnte 2004 das Problem jedoch durch den Einsatz eines Cu(I)-stabilisierenden Liganden (TBTA) selbst lösen.^[196] Seither ist es möglich, die kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition in wässriger Lösung mit DNA bei Raumtemperatur durchzuführen. Dies ist auch die Grundlage aller in dieser Arbeit durchgeführten Klick-Konjugationen mit DNA. Für die Reaktion wurde ein *Tetrakis(acetonitril)-kupfer(I)-hexafluorophosphat* Komplex zusammen mit dem bereits erwähnten TBTA-Liganden verwendet. Als Alkin wurde ausschließlich 2'-O-

Propargyl-Uridin verwendet, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. Das CyIQ-Azid wurde erfolgreich an einfach-, zweifach- und dreifach-modifizierte DNA geknüpft. Die daraus resultierenden DNA-Sonden sind in **Abb. 26** zusammengefasst.

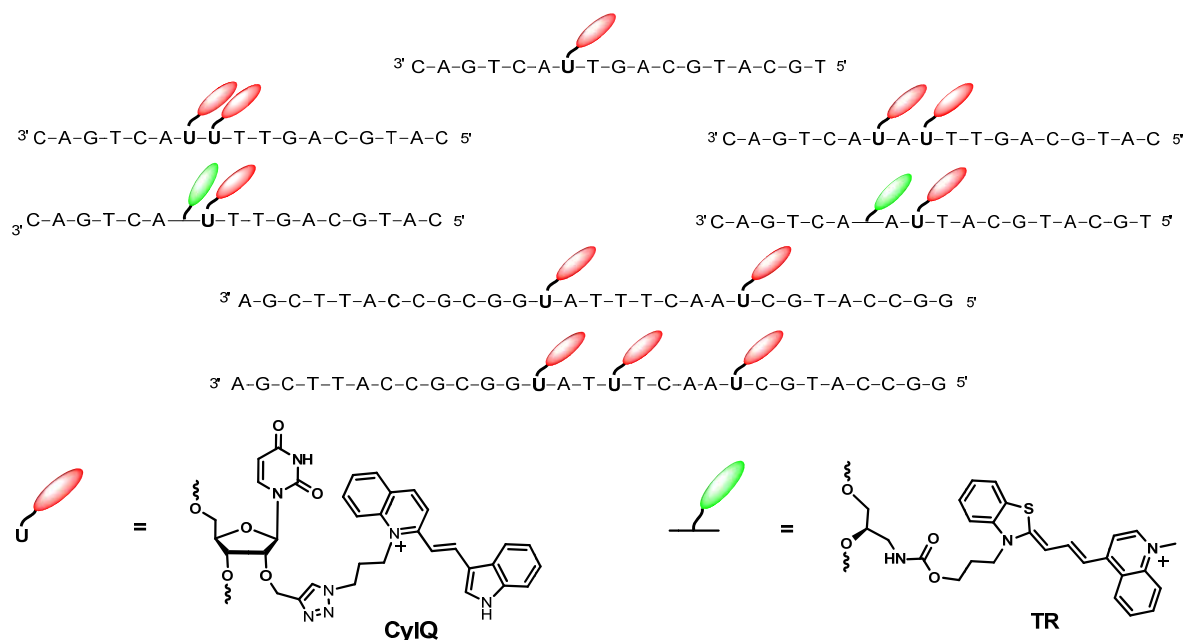


Abb. 26: Übersicht aller Grundtypen von Fluorophor-DNA-Verknüpfung die in dieser Arbeit synthetisiert wurden. CyIQ wurde jeweils postsynthetisch einfach, zweifach oder dreifach in die DNA eingebaut, wobei Thiazolrot (TR) via Phosphoramidit während der DNA-Synthese eingebaut wurde. Die Sequenzen sind nur exemplarisch.

Es stellt sich natürlich die Frage wie viele Modifikationen pro DNA-Strang auf diese Weise möglich sind. *Frank Seela*^[112] und *Thomas Carell*^[59, 74] zeigten bereits, dass Zweifach-, Dreifach- und sogar Sechsfach-Modifikationen^[64] postsynthetisch in DNA prinzipiell möglich sind. Auch in dieser Arbeit war es möglich, Zweifach- und Dreifach-Modifikationen mit CyIQ zu erhalten. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Aufreinigung der dreifach modifizierten DNA problematisch ist. Eine exakte Abtrennung von den unvollständig funktionalisierten Oligomeren via HPLC war nur unter großem Substanzverlust möglich. Für bestimmte bioanalytische Anwendungen ist es sehr wichtig, hochreine DNA-Fluorophor-Konjugate und damit eine definierte Anzahl an Chromophoren vorliegen zu haben. Für das CyIQ-Azid scheint hier die Obergrenze bei drei Modifikationen pro Strang zu liegen. Für höher modifizierte



Abb. 27: CyIQ-DNA in wässriger Lösung ist kräftig orange gefärbt.

Oligomere müssten alternative Reinigungsmethoden wie Gel- bzw. Kapillarelektrophorese erprobt werden oder auf eine andere Verknüpfung der Alkine gewechselt werden. Dafür würden sich Octadiinyl-Linker anbieten, bei denen die Dreifachbindung weiter von der DNA entfernt liegt.^[45, 64] Einfach- und Doppelmodifikationen sind jedoch ohne Probleme mit guter Ausbeute (Einfachmodifikationen bis zu 70 %; Doppelmodifikationen ca. 40 %) und hoher Reinheit möglich. Dabei überzeugt die einfache Handhabung der Klick-Chemie. Das einmal synthetisierte Azid ist äußerst stabil und kann bei Bedarf sofort in jede mögliche DNA-Sequenz eingebaut werden. Besonders interessant ist dabei auch die Möglichkeit, CylQ in Stränge zu knüpfen, die mit Thiazolrot vor-modifiziert waren. Offensichtlich ist eine effiziente postsynthetische Konjugation selbst dann möglich, wenn das entsprechende Alkin durch einen großen Chromophor bereits stereochemisch schwer zugänglich ist.

4.2 Untersuchung photophysikalischer und elektronischer Eigenschaften

Die grundlegenden photophysikalischen und elektronischen Eigenschaften eines Fluorophors bestimmen meist den Anwendungsbereich. Reduktions- oder Oxidationspotentiale eines Farbstoffs geben Hinweise auf mögliche Redoxreaktionen mit den DNA-Basen was zu deren Schädigung führen kann,^[194] oder allgemein Elektronentransferprozesse.^[197-199] In bestimmten Anwendungsbereichen können schädigende Prozesse durch Fluorophoresogar erwünscht sein, wie z.B. die Erzeugung von Singulett Sauerstoff in der photodynamischen Tumor-Therapie.^[200, 201] Zusammen mit anderen Eigenschaften wie Photoisomerisierung, Fluoreszenzquantenausbeute, Solvatochromie oder Photostabilität ergeben sich wichtige Charakteristika des optischen Markers. Es ist daher unerlässlich, bei der Entwicklung einer neuen DNA-Fluorophor-Sonde die photophysikalischen Grundeigenschaften zu kennen bzw. sie gezielt einzusetzen.

4.2.1 Absorptions- und Fluoreszenzverhalten von CylQ

Verhalten des freien Farbstoffs

CylQ ist als freier Farbstoff in vielen organischen Lösungsmitteln und in Wasser löslich. Dabei zeigt er ein ausgeprägtes solvatochromes Verhalten, das sich über knapp 50 nm von $\lambda = 450$ nm in Wasser bis $\lambda = 496$ nm in Tetrahydrofuran erstreckt. Die Absorptionsbanden von CylQ in THF, DMSO und DMF weisen im Vergleich zu allen anderen eine zusätzliche Feinstruktur auf. DMF und DMSO zeigen eine weitere Bande bei $\lambda = 570$ nm. Besonders ausgeprägt ist der Effekt bei THF. Hier entstehen neue Banden bei $\lambda = 365$ nm, 420 nm, 530 nm und 575 nm. Diese Beobachtungen weisen auf Aggreagationseffekte hin, die typisch für Cyanine sind.^[202-204] Diese ausgeprägten optischen Effekte, die durch die unterschiedlichen Lösungsmittel hervorgerufen werden, zeigen bereits, dass CylQ intensiv durch seine molekulare Umgebung beeinflusst wird.

Tabelle 5: Absorptionsmaxima von CyIQ (4) in unterschiedlichen Lösungsmitteln.

	H ₂ O	MeCN	MeNO ₂	Aceton	MeOH	DMF	DMSO	EtOH	DCM	THF
λ_{max} (Abs.)	450 nm	467 nm	467 nm	471 nm	477 nm	480 nm	480 nm	484 nm	484 nm	496 nm

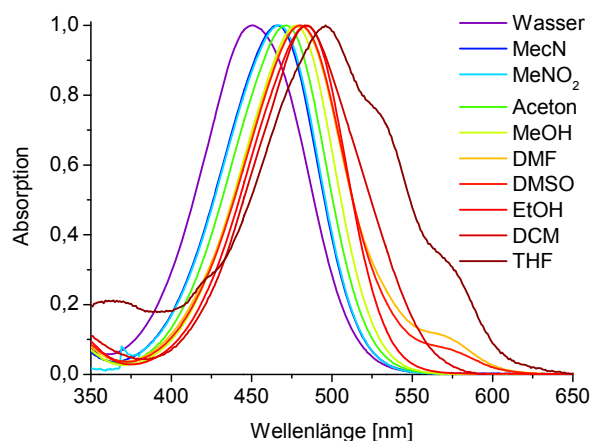


Abb. 28: Solvatochromes Verhalten von CyIQ, links: Absorptionsspektren (normiert) von freiem Farbstoff gelöst in unterschiedlichen Lösungsmitteln ($c = 438 \mu\text{M/L}$); rechts: sichtbare solvatochrome Effekte, v.l.n.r.: DMSO, DMF, THF, Aceton, DCM, MeCN, EtOH, MeOH, Wasser, Nitromethan.

CyIQ als 2'-Modifikation in DNA

Kovalent in DNA gebunden zeigt CyIQ eine breite Absorptionsbande zwischen $\lambda = 400 \text{ nm}$ und 550 nm mit einem Maximum bei 495 nm . Der Extinktionskoeffizient bewegt sich dabei typischerweise bei $\epsilon_{495} = 60.000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Abhängig ist er dabei von der DNA-Umgebung. Im Bereich von $\lambda = 260 \text{ nm}$ zeigt der Farbstoff eine schwache Absorptionsbande mit $\epsilon_{260} = 6.000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Angeregt bei $\lambda_{\text{exc}} = 495 \text{ nm}$ fluoresziert CyIQ typischerweise im Bereich von $\lambda = 500 \text{ nm}$ bis 700 nm mit einem Maximum bei $\lambda = (560 \pm 10) \text{ nm}$. Die Emission erfolgt also mit einer Stokes-Verschiebung von $\lambda = 75 \text{ nm}$. Die Unterschiede im Fluoreszenzmaximum sind zwischen Einzel- und Doppelstrang zu beobachten und werden auf Wechselwirkungen mit der DNA zurückgeführt. Die Fluoreszenzquantenausbeuten bewegen sich bei Einfachsträngen um 8% ($\Phi_{\text{dsDNA1}} = 0,08$), können aber je nach Sequenz stark variieren (vgl. Kapitel 0). Mit einer durchschnittlichen Helligkeit von 5600 erreicht CyIQ ein Drittel der Helligkeit von Cy3 in vergleichbaren DNA-Strängen. Die Helligkeit (B) ist das Produkt aus molarem Extinktionskoeffizient und Quantenausbeute.

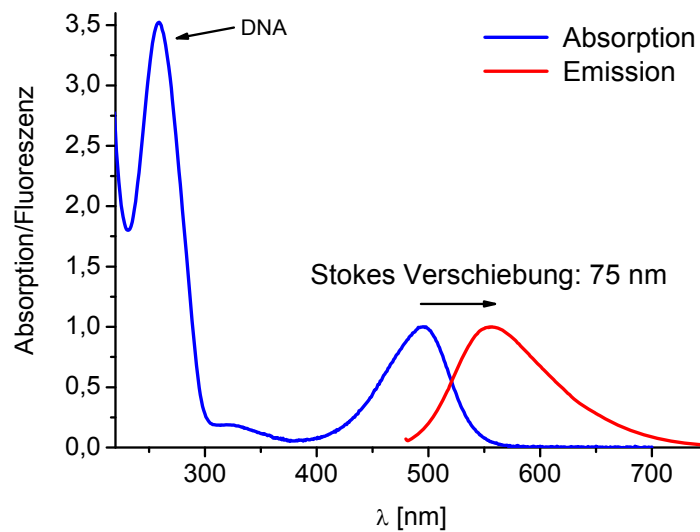


Abb. 29: Typisches Absorptions- und Fluoreszenzspektrum von CyIQ-DNA. Das Fluoreszenzmaximum wurde zur besseren Vergleichbarkeit mit dem Absorptionsmaximum auf 1 aus. normiert.

Fluoreszenztitration

Cyanine weisen einen für die DNA-Analytik bedeutenden Effekt auf. Frei in Lösung zeigen viele dieser Farbstoffe nahezu keine Fluoreszenz (z.B. CyIQ $\Phi_F^{\text{Puffer}} = 0,002$).^[35] Bei konformationeller Fixierung durch viskose Lösungsmittel steigt die Fluoreszenz jedoch stark an.^[31, 205, 206] Eine solche Fixierung der Konformation kann auch durch Interkalation in die DNA oder Bindung in eine der DNA-Furchen erfolgen (z.B. CyIQ $\Phi_F^{\text{RNA}} = 0,1$).^[28, 35] Wie kann man sich diesen Effekt erklären? Im Grundzustand liegen Cyanine in der Regel in der *all-trans* Konformation vor.^[207-209] Wird das freie Molekül durch Licht angeregt, so findet eine *cis-trans*-Isomerisierung bzw. eine Rotation um die gesamte Methinbrücke statt.^[210] Dadurch kommt es zu einer strahlungslosen Desaktivierung des angeregten Zustandes.^[211] Wird dieser strahlungslose Relaxationsprozess durch Fixierung unterbunden, so steigt die Fluoreszenz. Ein zweiter Grund ist, dass durch die Fixierung der Rotationsbewegung eine annähernd planare Ausrichtung der beiden Chromophor-Teile (Auxochrom und Antiauxochrom) erreicht wird, was die HOMO-LUMO-Wechselwirkung deutlich verbessert (s. **Abb. 30**).^[206]

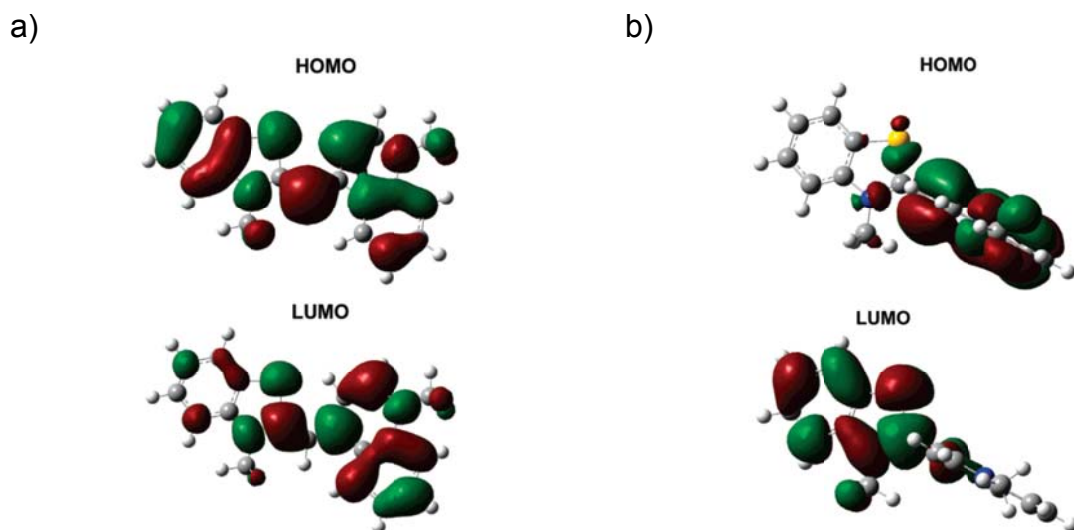


Abb. 30: Mittels SAM1 berechnete HOMOs und LUMOs von Thiazolorange im Grundzustand. **a)** In annähernd planarer Ausrichtung ist eine gute Wechselwirkung möglich. **b)** Bei einer Rotation von 90° um die Methinbrücke sind die Orbitalbereiche räumlich voneinander getrennt, was eine effektive Wechselwirkung verhindert (Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. ^[206] Copyright American Chemical Society 2007).

Die Fixierung der Rotation um die Polymethinbrücke wird heute als Hauptursache für den Fluoreszenzanstieg betrachtet.^[206, 211, 212] Wie stark dieser Fluoreszenzanstieg ist, lässt sich am besten an einem Titrationsexperiment beobachten. Hierbei wird freier Farbstoff zu doppelsträngiger DNA titriert.

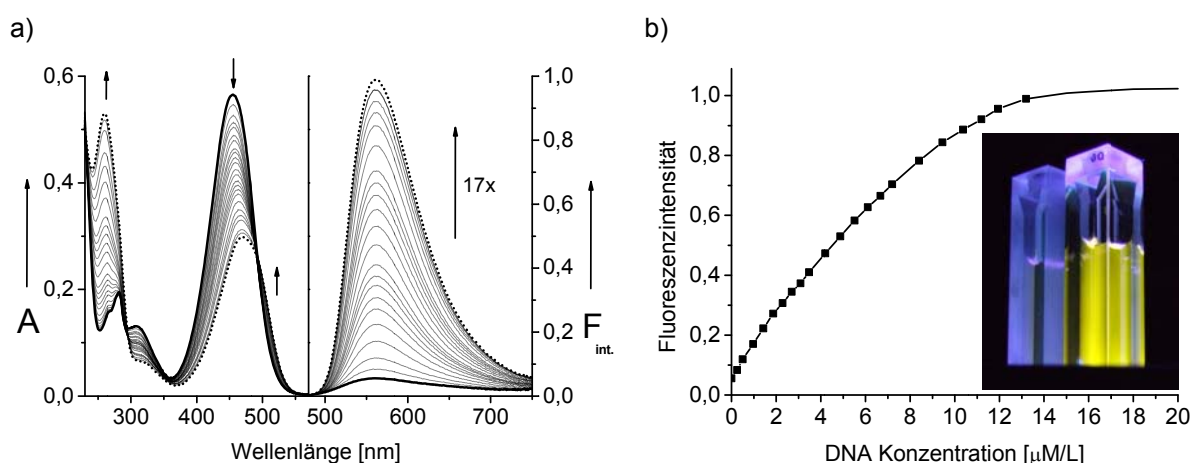


Abb. 31: **a)** Titration von freiem Farbstoff **4** (kompakte Linie) zu doppelsträngiger DNA (gepunktete Linie); **b)** Sättigungskurve der Titration. Das Bild im Graphen zeigt die Küvetten am Anfang der Titration ohne DNA (links) und am Ende mit $13,2 \mu\text{M}$ DNA (rechts).

Im Titrationsexperiment zeigt CylQ einen beeindruckenden Fluoreszenzanstieg um das siebzehnfache in Anwesenheit von doppelsträngiger DNA, was den Untersuchungen von *Chang et al.* entspricht.^[35] Der starke Fluoreszenzanstieg ist besonders interessant, da in vergleichbaren Experimenten mit dem Standard DNA-Anfärbereagenz Ethidiumbromid nur ein zehnfacher Anstieg beobachtet wurde.^[198] Auch das Absorptionsspektrum zeigt typische Veränderungen. Das Absorptionsmaximum verschiebt sich dabei von $\lambda = 455$ nm (freier Farbstoff) hin zu $\lambda = 470$ nm (Farbstoff mit DNA) unter Ausbildung eines isosbestischen Punktes bei $\lambda = 490$ nm. Die bathochrome Verschiebung und der Rückgang des Extinktionskoeffizienten sind für Cyanine charakteristisch^[30] und können durch Aggregation entstehen.^[204] Exakt dieser Effekt wurde 2007 von *Armitage et al.* für Thiazolorange beschrieben.^[206] Die Aggregationseffekte werden im Abschnitt der CylQ-Dimere noch intensiver diskutiert.

4.2.2 Redoxeigenschaften

Die Redoxeigenschaften eines Farbstoffs gehören wie das Absorptions- und Emissionsverhalten zu den grundlegenden Merkmalen eines Chromophors. Vor allem im Bereich der Bioanalytik und DNA-Analytik spielen sie eine wichtige Rolle, da Reaktionen eines angeregten Fluorophores mit der biologischen Umgebung unter Fluoreszenzänderung möglich sind. So lässt sich z.B. Guanin aufgrund seines niedrigen Potentials durch Ladungstransfer^[213] gut oxidieren.^[194] Die Oxidation einer Nukleobase führt zu Einbußen in der Fluoreszenzintensität bis hin zu vollständiger Fluoreszenzlöschung.^[214, 215] Viel schlimmer sind jedoch die Folgen für den lebenden Organismus wenn durch photoinduzierten Ladungstransfer in der DNA irreversible Oxidations- oder Reduktionsschäden entstehen.^[213] Werden derartige Schäden enzymatisch nicht repariert, so kann es zur Mutation und zum Verlust der genetischen Information des betroffenen Abschnittes kommen. Wie kann man sich die Vorgänge zwischen DNA und Fluorophor vorstellen? Beim photoinduzierten Lochtransfer (HT) nimmt der angeregte Chromophor ein Elektron aus der DNA auf und wird reduziert. In der DNA entstehen die kationischen Radikale des Guanins ($G^{\bullet+}$) und des Adenins ($A^{\bullet+}$). Beim reduktiven Elektronentransfer (ET) wird ein Elektron des photoangeregten Chromophors auf die DNA übertragen und es entstehen hauptsächlich die anionischen Radikale von Cytosin ($C^{\bullet-}$) und Thymin ($T^{\bullet-}$).

Der häufigere und biologisch bedeutendere Mechanismus ist der oxidative Ladungstransfer mit Guanin.

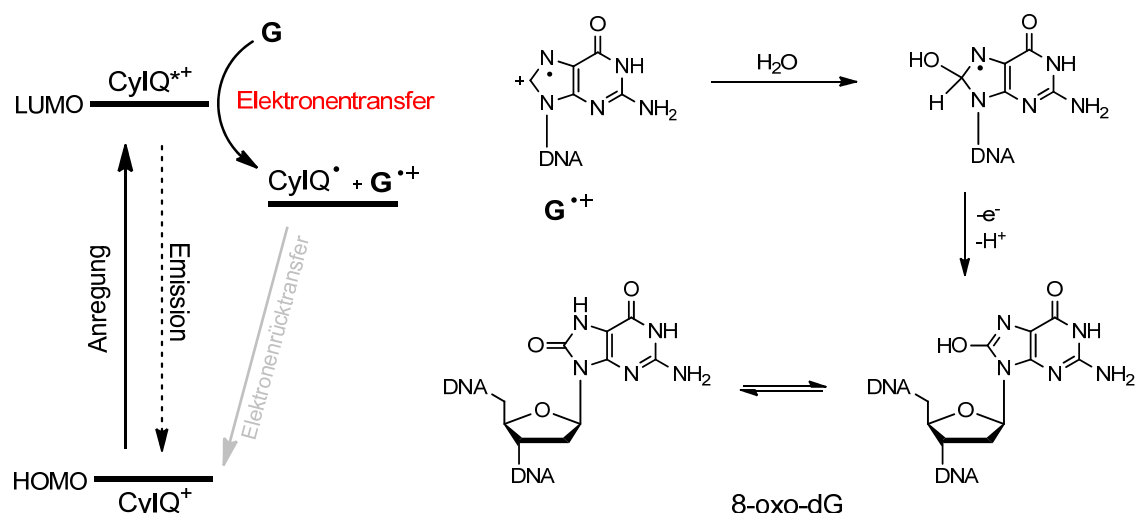


Abb. 32: Mechanismus zur Entstehung mutagener, radikalisch verursachter DNA-Schäden am Beispiel des Guanins. Durch eine Elektronentransferreaktion des photoangeregten Chromophors mit Guanin entsteht ein Guanin Radikal Kation. Im wässrigen Medium reagiert es zu 8-oxo-dG, was nur einer von vielen DNA Schäden ist.^[194] Im weiteren Verlauf wird durch 8-oxo-dG bei der Replikation ein TA-Basenpaar anstelle eines GC-Basenpaares in die DNA eingebaut. Eine Mutation ist entstanden.

Mittels Cyclovoltammetrie wurden die Redoxpotentiale von Verbindung **3** (CylQ-OH) im Grundzustand ermittelt. Der Chromophor wurde in einer drei Elektroden Anordnung in trockenem DMF mit Tetrabutylammoniumhexafluorophosphat als Leitsalz gemessen. Daraus ergeben sich die Halbstufenpotentiale für die jeweiligen Redoxprozesse. Die so gemessenen Daten werden auf Ferrocen bezogen (vs. Fc), das als Referenzsubstanz dient bzw. mit 0,63 V summiert woraus sich die Vergleichswerte gegen die Normalwasserstoffelektrode (NHE) ergeben.^[216] Für CylQ ergeben sich drei charakteristische Potentiale: Ein irreversibles Reduktionspotential bei -1,44 V (vs. Fc entspr. -0,81 V vs. NHE), ein irreversibles Oxidationspotential bei -0,09 V (vs. Fc entspr. 0,54 V vs. NHE) und ein zweites Oxidationspotential bei 0,10 V (vs. Fc entspr. 0,73 V vs. NHE). Dieses ist reversibel und setzt sich aus den entsprechenden Halbstufenpotentialen zusammen (vgl. **Abb. 33**). Im Weiteren wird mit den Werten, die gegen die Normalwasserstoffelektrode (vs. NHE) bezogen sind, gearbeitet.

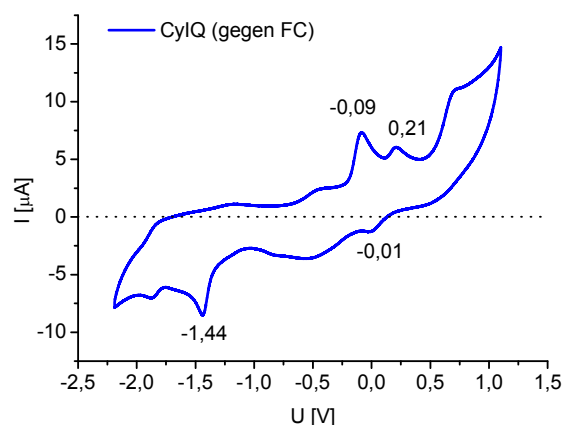


Abb. 33: Cyclovoltammogramm von CyIQ (4) gegen Ferrocen (Fc).

Um eine Aussage über das Oxidations- und Reduktionsverhalten des photoangeregten Chromophors zu treffen, müssen die Redoxpotentiale im angeregten Zustand ermittelt werden. Da dies mit den vorhandenen Geräten experimentell nicht möglich ist, werden die Werte rechnerisch genähert. Dazu benötigt man den E_{00} -Wert. Dieser ist die Energiedifferenz zwischen Schwingungsgrundzustand und dem Schwingungsgrundzustand des ersten angeregten Zustandes. Diesen erhält man aus dem überlappenden Absorptions- und Emissionsspektrum von CyIQ (s. **Abb. 33**). Die Wellenlänge am Schnittpunkt liefert die entsprechende Photonenenergie nach folgender Gleichung:

$$E_{00} = \frac{h \cdot c}{\lambda}$$

mit	h:	Plancksches Wirkungsquantum
	c:	Lichtgeschwindigkeit
	λ :	Wellenlänge am Schnittpunkt
	E_{00} :	Singulett-Energie des HOMO-LUMO-Übergangs

Die E_{00} -Energie für CyIQ beträgt somit 2,4 eV (bei $\lambda = 512 \text{ nm}$). In Abhängigkeit des jeweiligen Ladungstransfers errechnen sich die Redoxpotentiale des angeregten Zustandes wie folgt:

$$E_{red}^*(Do) = E_{red}(Do) + E_{00}$$

$$E_{ox}^*(Do) = E_{ox}(Do) - E_{00}$$

Daraus ergibt sich für CyIQ ein Reduktionspotential im angeregten Zustand von $E_{red}^*(CyIQ^+/CyIQ^*) = 1,6$ V. Die Oxidationspotentiale im angeregten Zustand betragen $E_{ox1}^*(CyIQ^+/CyIQ^{2+}) = -1,9$ V und $E_{ox2}^*(CyIQ^+/CyIQ^{2+}) = -1,7$ V. Ob bei diesen Werten eine Oxidation bzw. Reduktion von Nukleobasen möglich ist, lässt sich über die Triebkraft der Ladungstransferreaktion abschätzen, welche man aus der *Rehm-Weller*-Gleichung ableitet.^[217, 218]

$$\Delta G_{ET} = e[E_{ox} - E_{red}] - E_{00} + C$$

mit	ΔG_{ET} :	freie Enthalpie des Ladungstrfers (ET = Elektronentransfer)
	e:	Elementarladung
	E_{ox} :	Oxidationspotential des Grundzustandes
	E_{red} :	Reduktionspotential des Grundzustandes
	E_{00} :	Singulett-Energie des HOMO-LUMO-Übergangs
	C:	Änderung der <i>Coulomb</i> -Energie, hier näherungsweise C = 0

Da die Redoxpotentiale im angeregten Zustand bereits errechnet wurden, kann der E_{00} -Operator in der *Rehm-Weller*-Gleichung wegfallen und ΔG wird wie folgt berechnet:

$$\Delta G_{HT} = e[E_{ox}(Ak) - E_{red}^*(CyIQ)] \quad \text{oxidativer Lochtransfer (HT)}$$

$$\Delta G_{ET} = e[E_{ox}^*(CyIQ) - E_{red}(Ak)] \quad \text{reduktiver Elektronentransfer (ET)}$$

Die photoinduzierte Oxidation von Guanin durch CyIQ ist mit $\Delta G \approx -0,3$ eV exergon und somit sehr wahrscheinlich. Die Oxidation von Adenin scheint zunächst mit $\Delta G \approx -0,2$ eV wahrscheinlich. Da die Literaturwerte für das Oxidationspotential von A schwanken und für einen Wert von $E_{ox}(A/A^+) = 2,0$ V^[219] die Reaktion nicht möglich ist, bleibt die Vorhersage für A nicht eindeutig. Experimente in Abschnitt 0 werden hier Klarheit schaffen. Die Triebkraft für eine photoinduzierte Reduktion der DNA-Basen T, C und U liegt mit $\Delta G \approx 0,2 - 0,5$ eV im endergonen Bereich. Es ist jedoch

bekannt, dass sich die Reduktionspotentiale von Nukleobasen in protischen Lösungsmitteln auf Werte von bis ca. -1,0 eV (vs. NHE) erhöhen können.^[219, 220] Eine photoinduzierte Reduktion kann also nicht völlig ausgeschlossen werden, erscheint aber weniger wahrscheinlich als eine Oxidation von G. Untersuchungen im Kapitel 0 werden diese Abschätzung bestätigen.

Was bedeutet nun das Redoxverhalten eines Chromophors für die Praxis? Für bestimmte Methoden sind oxidierende oder reduzierende Eigenschaften eines Chromophors erwünscht, so z. B. bei der Erforschung von Ladungstransfermechanismen^[41, 197] oder in der photodynamischen Krebstherapie.^[200, 201, 221] In vielen Bereichen der Bioanalytik sind hohe Redoxpotentiale jedoch eher störend und sollen vermieden werden. Später wird sich in dieser Arbeit zeigen, dass die Redoxeigenschaften von CylQ von besonderer Bedeutung sind und den Farbstoff erst dadurch zu einer vielversprechenden Sonde machen.

Tabelle 6: Übersicht der Redoxpotentiale von CylQ (X = **3**) und der vier Nukleobasen (vs. NHE).

	$E_{\text{red}}(X/X^{\cdot-})$	$E_{\text{ox1}}(X/X^{++})$	$E_{\text{ox2}}(X/X^{++})$	$E_{\text{red}}^*(X^{\cdot-}/X^{\cdot-})$	$E_{\text{ox1}}^*(X^{\cdot-}/X^{++})$	$E_{\text{ox2}}^*(X^{\cdot-}/X^{++})$
CylQ	- 0,81 V	0,54 V	0,73 V	1,6 V	- 1,9 V	- 1,7 V

Redoxpotentiale der einzelnen Nukleobasen gemäß Literatur:

$$E_{\text{ox}}(G/G^{++}) = 1,3 \text{ V};^{[222]} \quad E_{\text{ox}}(A/A^{++}) = 1,4 \text{ V}^{[222]} \text{ bzw. } 1,9 \text{ V};^{[219]}$$

$$E_{\text{red}}(T/T^{\cdot-}) = -2,1 \text{ V};^{[223]} \quad E_{\text{red}}(C/C^{\cdot-}) = -2,2 \text{ V};^{[223]} \quad E_{\text{red}}(U/U^{\cdot-}) = -2,1 \text{ V};^{[223]}$$

4.2.3 Photostabilität

Die Photostabilität organischer Chromophore spielt eine entscheidende Rolle für Methoden der Bioanalytik, bei denen Prozesse über längere Zeit oder unter starker Bestrahlung betrachtet werden sollen. Schnell ausbleichende Farbstoffe liefern keine oder nur noch unzuverlässige Signale.^[224] Vor allem beim Einsatz in der Fluoreszenzmikroskopie sind Farbstoffe mit hoher Stabilität sehr gefragt.^[225, 226] Die Betrachtung der Photostabilität eines neuen Farbstoffs muss daher in Relation zu bereits etablierten Farbstoffen geschehen. In dieser Arbeit wird daher die Photostabilität von CylQ im Vergleich zu Fluorescein, Thiazolorange, Thiazolrot, BODIPY und Cy3 untersucht. Alle Farbstoffe wurden kovalent in DNA eingebaut.

DNA1 (CylQ)	3'- C-A-G-T-C-A- X -T-G-A-C-G-T-A-C-G-T- 5'	X = Position d. Chromophore
DNA4 (CylQ)	3'- A-G-T-C-A-C-T-G- X -G-T-C-T-G-A-C-G- 5'	
TO/TR	3'- A-G-T-C-A-C-T-G- X -G-T-C-T-G-A-C-G- 5'	
BODIPY	3'- A-G-T-C-A-C-T-T- X -T-T-C-T-G-A-C-G- 5'	
Fluorescein	3'- A-G-T-C-A-C-T-T- X -T-T-C-T-G-A-C-G- 5'	
Cy3	3'- C-A-G-T-C-A-G-T-G-A-C-G-T-A-C-G-T- X - 5'	
Cy3-2	3'- C-A-G-T-C-A- X -T-G-A-C-G-T-A-C-G-T- 5'	

Um eine Bestrahlung mit gleichmäßig hoher Energie zu gewährleisten, wurden die Proben mit einer 75 W Xe-Bogenlampe belichtet, die in einem Bereich von $\lambda = 400 \text{ nm} - 600 \text{ nm}$ eine kontinuierliche Intensität aufweist. Ein 305 nm Langpass-(cut-off) Filter verhindert bei den Experimenten eine direkte photochemische Schädigung der DNA. Nach der jeweiligen Belichtungszeit wurde unverzüglich die Absorption und Emission der Probe gemessen. Bei allen Farbstoffen wird eine Abnahme der Absorption und Fluoreszenz bei längerer Belichtungszeit beobachtet (s. Abb. 34). Die DNA-typische Absorption bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ bleibt im Wesentlichen bestehen, zeigt aber eine leichte Abnahme mit hypsochromer Verschiebung. Diese kann man auf photoinduzierte DNA-Schäden mit Strangbrüchen zurückzuführen, was durch HPLC-Analyse bestätigt wurde. Um die unterschiedlichen Fluorophor-Sonden vergleichen zu können, wurde jeweils das Fluoreszenzmaximum in Abhängigkeit zur Bestrahlungsdauer aufgetragen und der Anfangswert auf 100% Fluoreszenz normiert (**Abb. 35**).

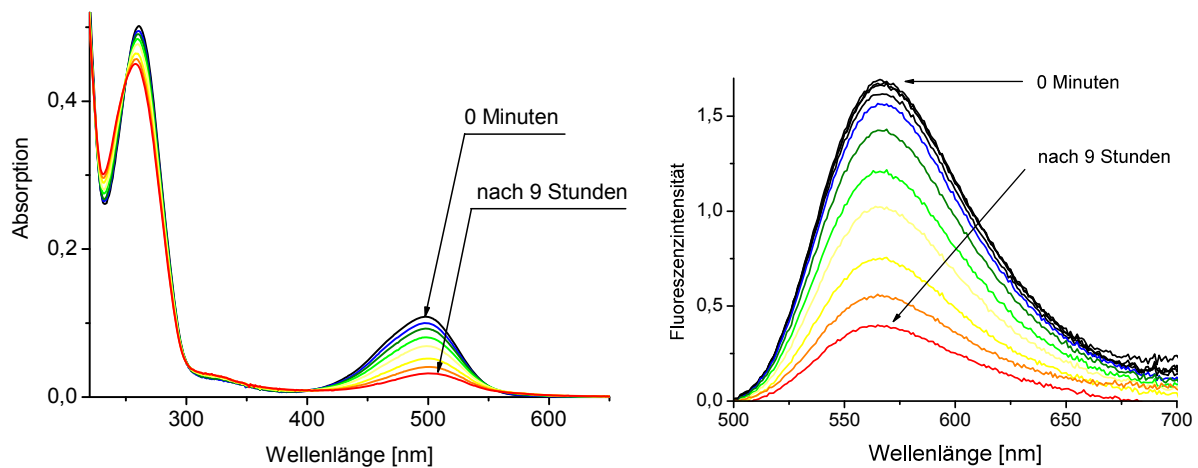


Abb. 34: Photoinduziertes Ausbleichen am Beispiel von CyIQ (dsDNA1). Das Absorptionsspektrum links zeigt die Abnahme der Extinktion des Farbstoffs ($\lambda = 495 \text{ nm}$) bei zunehmender Bestrahlung. Als Konsequenz sinkt auch die Fluoreszenz (rechts, $\lambda_{\text{exc}} = 495 \text{ nm}$) entsprechend. Die Absorption der DNA bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ bleibt im Wesentlichen bestehen. Die Spektren aller Proben verhielten sich gleich.

Gleich auf den ersten Blick wird deutlich, dass CyIQ eine bessere Photostabilität im Vergleich zu Fluorescein, BODIPY, Thiazolorange und Thiazolrot aufweist. Erst nach 20-stündiger Belichtung sind nur noch 10 % CyIQ-Fluoreszenz messbar. Bei BODIPY ist dieser Wert bereits nach 10 Minuten erreicht; auch die anderen Farbstoffe sind spätestens nach zwei Stunden ausgebleicht. Einzig Cy3 weist eine deutlich bessere Photostabilität auf. Die hohe Stabilität von CyIQ und Cy3 wird besonders deutlich, wenn man die Zeitspanne betrachtet, bis nur noch die Hälfte an Fluoreszenz vorhanden ist (s. Tabelle 7). Bei TR und BODIPY ist dies innerhalb weniger Minuten der Fall, wobei TO und Fluorescein sich schon etwas stabiler verhält und dafür 30 Minuten benötigen. Nach 30-minütiger Bestrahlung sind von CyIQ und Cy3 immer noch über 90 % der ursprünglichen Fluoreszenz vorhanden.

Tabelle 7: Halbwertszeiten für die untersuchten Chromophore im Doppelstrang.

	ds BODIPY	ds TR	ds TO	ds Fluores.	ds CyIQ	ds Cy3
$t_{0,5} \text{ (min)}$	2,4	9,6	43,1	40,3	335,3	1850,5

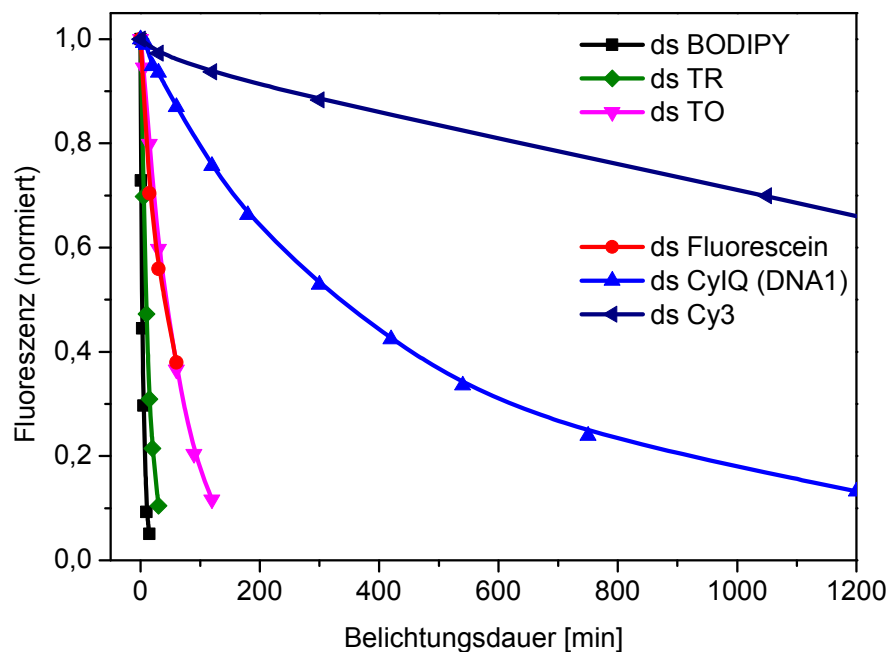


Abb. 35: Vergleich der Photostabilitäten aller untersuchten Farbstoffe. CyIQ zeigt eine bessere Photostabilität gegenüber Thiazolorange (TO), Thiazolrot (TR), Fluorescein und BODIPY. Einzig Cy3 ist stabiler.

In diesem ersten Versuch lagen alle Proben in Form von doppelsträngiger DNA vor. Die Photodegradierung eines Farbstoffs ist jedoch von unterschiedlichen Faktoren abhängig wie z.B. von der biologischen Umgebung.^[31, 227-229] Daher wurden alle Systeme auch im Einzelstrang gemessen (vgl. Tabelle 8 und **Abb. 36**). Die Farbstoffe im Doppelstrang sind jeweils etwas stabiler als im Einzelstrang (außer Thiazolrot). Im Doppelstrang liegen die Chromophore teilweise in einer der Furchen oder interkalieren in die DNA was ihnen einen höheren Schutz bietet als im freien Einzelstrang und die Unterschiede erklärt. Bei keiner der Fluorophor-Sonden zeigte sich jedoch eine signifikante Abweichung zu den Messungen im Doppelstrang. Für die Photostabilität der untersuchten Farbstoffe spielt offensichtlich der Unterschied zwischen Doppel- und Einzelstrang-DNA keine tragende Rolle. Diese Erkenntnis ist vor allem wichtig für Hybridisierungssonden. Würde entweder der Einzel- oder Doppelstrang schneller ausbleichen, so würde dies zu falschen Ergebnissen führen.

Tabelle 8: Halbwertszeiten der Cyaninfarbstoffe TR, TO und CylQ in Einzel- und Doppelsträngigen Oligomeren.

	ss TR	ds TR	ss TO	ds TO	ssDNA1	dsDNA1	ssDNA4	dsDNA4
$t_{0,5}$ (min)	7,4	9,6	53,3	43,1	266,3	335,3	276,4	298,9

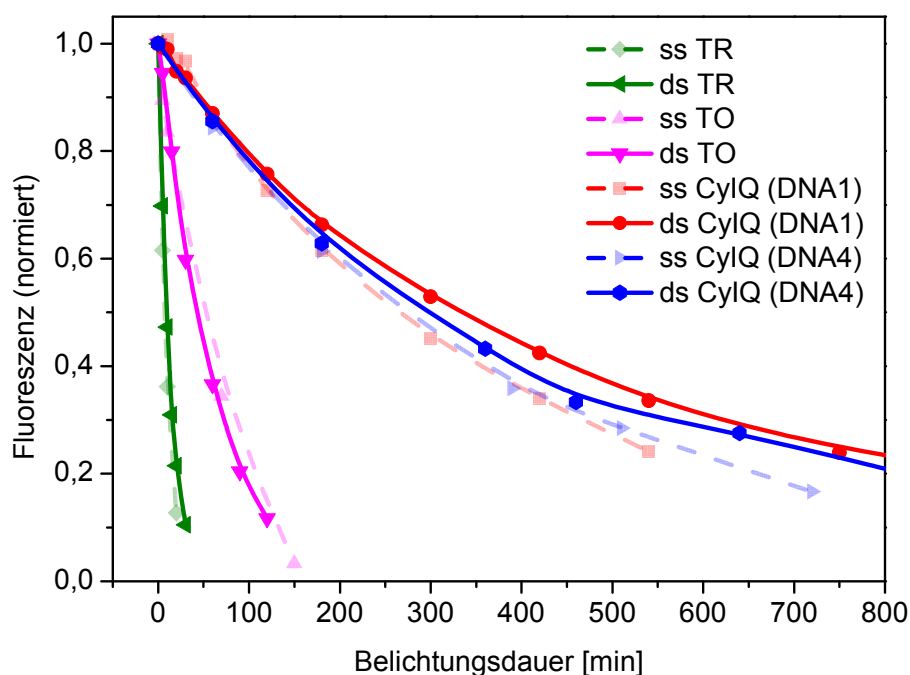


Abb. 36: Untersuchung unterschiedlicher Umgebungsfaktoren auf die Photostabilität. Einfluss von DNA-Sequenz (Guanin Umgebung in DNA4) und Einzel- bzw. Doppelstrang-DNA. Beides hat keinen entscheidenden Effekt auf die Photostabilität.

Ein kritischer Punkt bei Fluorophoren ist deren Möglichkeit, photochemische Reaktionen durch Ladungstransfer mit DNA-Basen einzugehen und dabei an Fluoreszenz zu verlieren.^[31, 222, 223, 229, 230] Man spricht hierbei von „*Photoquenching*“. Wie bereits unter 4.2.2 Redoxeigenschaften gezeigt, besitzt CylQ die Eigenschaft, Guanin zu oxidieren und damit an Fluoreszenzintensität zu verlieren. Um auszuschließen, dass dieser Prozess die Photostabilität stark beeinflusst, wurde CylQ zwischen zwei Guanin-Basen in DNA4 eingebaut und mit DNA1 verglichen. Es zeigt sich auch hier kein signifikanter Unterschied. Die Photostabilität von CylQ ist also weitgehend unabhängig von der DNA-Sequenz und dem Einsatz in Doppel- oder Einzelstrang-DNA, was den Farbstoff in seiner Anwendbarkeit nicht einschränkt.

Es stellt sich natürlich die Frage: Wieso ist CyIQ so photostabil? Die Literatur liefert bis heute keine systematische Beschreibung der Photostabilität von Cyaninfarbstoffen.^[231] Klar ist, dass Farbstoffe durch sogenannte reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zerstört werden. ROS wie Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) und Sauerstoffradikale ($\text{O}_2^{\cdot-}$) werden in situ durch eine Energietransferreaktion aus dem Triplettzustand des Farbstoffs gebildet. Der Chromophor selbst agiert somit als Sensibilisator.^[31, 232] Die ROS können anschließend nach drei unterschiedlichen Mechanismen mit den Farbstoffen reagieren.^[233] Was den Mechanismus der Photodegradierung von Cyaninen betrifft, so wird dieser in erster Linie durch eine Reaktion von Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) mit olefinischen Teilstrukturen in Form einer [2+2]-Cycloaddition verursacht.^[231-239]

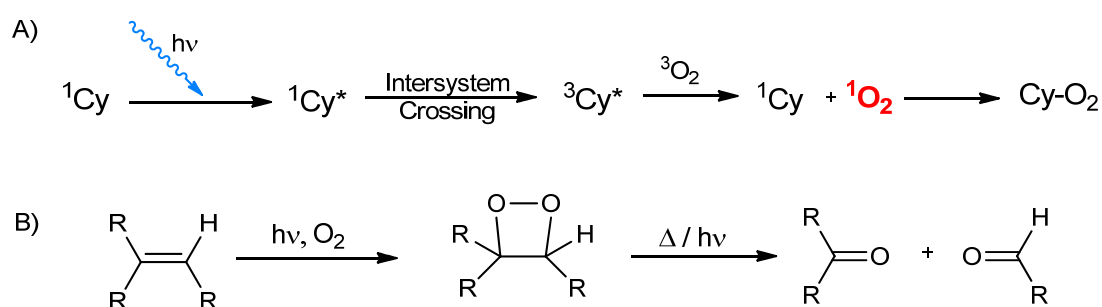


Abb. 37: Die beiden wichtigsten Prozesse der Photodegradierung von Cyaninfarbstoffen: **A)** Entstehung von Singulett Sauerstoff nach dem Typ II Mechanismus. Der Chromophor im Grundzustand (^1Cy) wird durch Licht angeregt ($^1\text{Cy}^*$) und durch ISC in den Triplett Zustand überführt ($^3\text{Cy}^*$). Durch eine Energietransferreaktion wird energetisch armer Triplett-Sauerstoff ($^3\text{O}_2$) in den reaktiven Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) überführt der mit dem Farbstoff reagieren kann (Cy-O_2). **B)** Singulett-Sauerstoff kann mit olefinischen Strukturen in Form dreier unterschiedlicher Additionsreaktionen reagieren, wobei für Cyaninfarbstoffe eine [2+2]-Cycloaddition die wahrscheinlichste ist.

Das Additionsprodukt führt zu sp^3 -Zentren, welche die Konjugation des π -Elektronensystems aufheben; das Molekül verliert an Farbigkeit. Die Polymethinkette ist der hauptsächliche Angriffsort dieser Addition. Das gebildete Dioxetan-Produkt kann schließlich in zwei Carbonyl-Teile aufbrechen (s. **Abb. 37**).^[231-234, 238] Auch ein Angriff an konjugierte Doppelbindungen der beiden Heterocyclen links und rechts der Methinbrücke werden als möglich erachtet.^[240] Trotzdem scheint die Polymethinbrücke die zentrale Rolle im Prozess der Photodegradierung zu spielen. Diese Vermutung wird durch eine Reihe von Arbeiten gestützt, bei denen dieser Teil der Moleküle mit Substituenten modifiziert,^[231, 235, 241, 242] oder durch Cyclodextrine

geschützt wurde.^[243] Alle Ansätze konnten die Photostabilität enorm verbessern. Experimentell konnte dieser Mechanismus auch für CyIQ bestätigt werden. Nach Bestrahlung (30 h) einer wässrigen Lösung von CyIQ (**4**) konnte massenspektroskopisch zu großen Teilen das Dioxetan-Produkt sowie die daraus folgenden Zerfallsprodukte identifiziert werden.

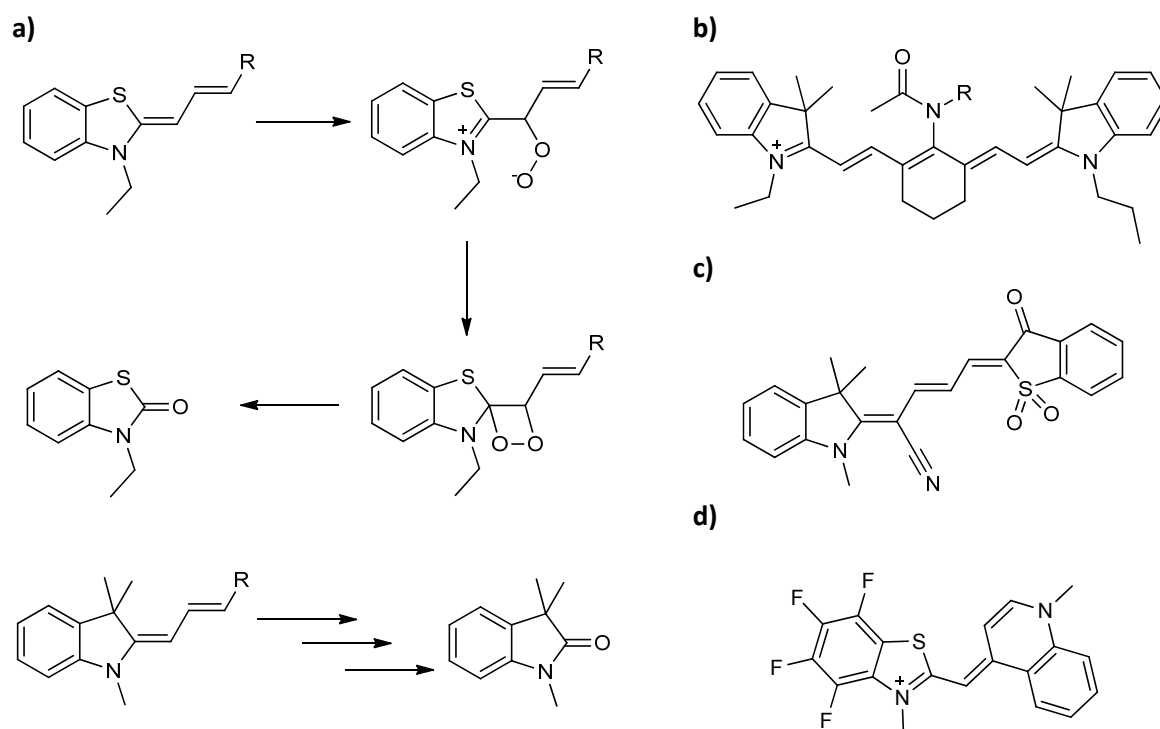


Abb. 38: a) Zwei Beispiele zur Photodegradierung mit Singulett-Sauerstoff nach *Hahn et al.*^[235] Beispiele zur Verbesserung der Photostabilität durch Einbau Elektronenziehender Gruppen durch *Chang et al.*^[231] (b) und *Hahn et al.*^[235] (c), oder durch Polyfluorierung nach *Armitage et. al.*^[244, 245] (d).

Betrachtet man nun die Cyaninfarbstoffe, welche in dieser Arbeit untersucht wurden, so fällt auf, dass die Stabilität von den Thiazol-Derivaten über CyIQ hin zu Cy3 zunimmt, also mit steigender Länge der Polymethinbrücke (s. **Abb. 39**). In der Literatur wird jedoch beschrieben, dass die Photostabilität von konjugierten Polymethinsystemen mit steigender Kettenlänge abnimmt.^[31, 228] Dies macht Sinn, wenn man bedenkt, dass gerade β -Carotin mit seinem ausgedehnten π -System ein besonders guter Reaktionspartner für Singulett-Sauerstoff ist.^[246] Die Kettenlänge kann also nicht der Grund für die beobachteten Stabilitäten sein. Der Grund verbirgt sich hinter den unterschiedlichen Strukturen der konjugierten Heterocyclen.

Benzothiazol im Thiazolorange und Thiazolrot, Chinolin und Indol im CyIQ und Dimethylindol im Cy3. Heterocyclen mit positiver Ladung scheinen stabiler zu sein als solche ohne.^[227] Cyanine mit Benzothiazolen scheinen deutlich labiler zu sein als solche mit Indolen.^[31, 235] Diese beiden Beobachtungen stehen auch im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Ein weiterer Faktor sind Gegen Ionen. Von *Kuzmin et al.*^[247] konnte gezeigt werden, dass Iodid als Gegenion zur positiven Ladung im Heterocyclen stabilisierend wirkt. Da mit den Farbstoffen aber meist in wässrigen Pufferlösungen gearbeitet wird ist dieser Effekt unerheblich.

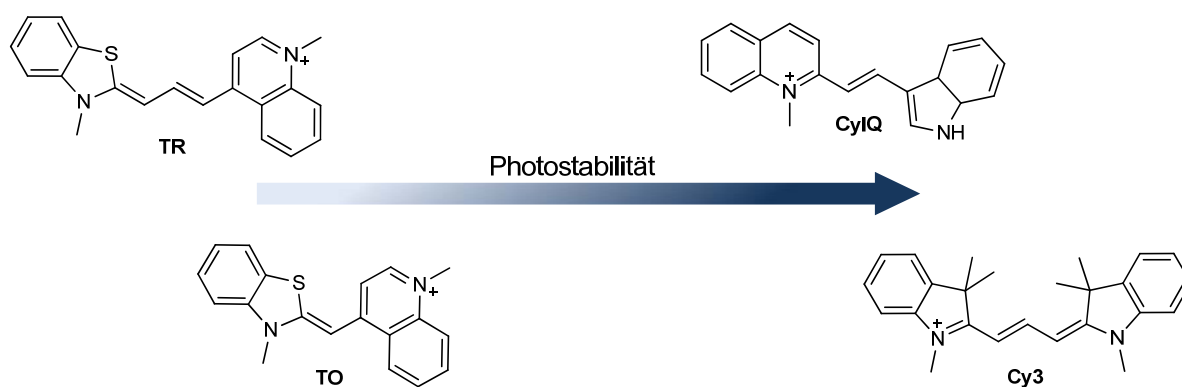


Abb. 39: Das unterschiedliche Photostabilitätsverhalten der untersuchten Cyaninfarbstoffe in DNA. Die Elektronendichte der Polymethinkette und die Kettenlänge selbst scheinen die Hauptgründe für die unterschiedliche Stabilität da Singulett-Sauerstoff als Elektrophil besonders Elektronenreiche Positionen angreift. Thia- und Oxacarbocyanine sind deutlich photolabiler. Dabei ist TO stabiler als TR, da es eine kürze Methinkette besitzt. CyIQ ist aufgrund seiner positiven Ladung (Elektronenzug) und der kurzen Methinkette besonders stabil. Nur Cy3 ist stabiler. Es ist aus den besonders stabilisierenden Indol-Heterocyclen aufgebaut und besitzt eine relativ kurze Methinkette.

Fasst man alle Aspekte zusammen, so wird ein Grundsatz deutlich: Alle Maßnahmen, im Rahmen welcher der Methinbrücke Elektronendichte entzogen wird, führen gleichzeitig zu erhöhter Photostabilität. Dies geschieht durch positive Ladung im Heterocyclen, durch elektronenziehende Gruppen in der Methinkette selbst,^[231, 235, 245] durch elektronenziehende Nitro- oder Nitril-Gruppen am Heterocyclen^[239] oder durch induktive Effekte (-I-Effekt) polyfluorierter Aromaten.^[244, 245] Singulett-Sauerstoff reagiert aufgrund der Spinumkehr und des damit freien p-Orbitals als Elektrophil,^[233, 240, 248] addiert also bevorzugt an Orte hoher Elektronendichte, wie dem Polymethinsystem. Wird dem Polymethinsystem die Elektronendichte entzogen, so reagiert es schlechter mit Singulett-Sauerstoff und bleibt stabil. Im Umkehrschluss zeigt dies, dass Elektronen schiebende Gruppen oder Heteroatome

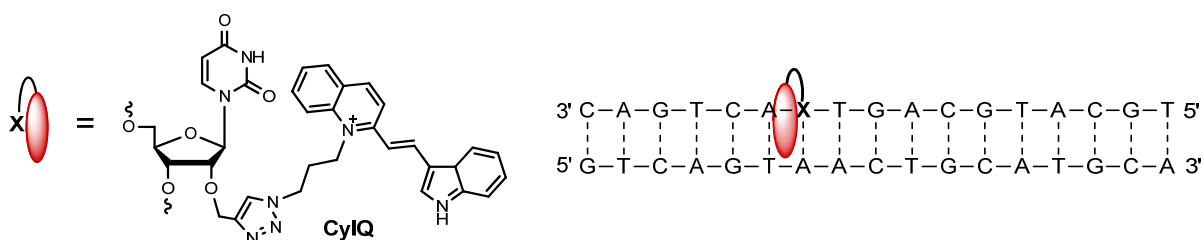
wie z. B. der Schwefel im Thiazol für die geringere Photostabilität verantwortlich sind. Es lässt sich auch die geringere Photostabilität langkettiger Polymethine (z.B. Nonamethin-Cyaninfarbstoffe) erklären. An den Kohlenstoffatomen der Rotationszentren der *cis-trans*-Photoisomerisierung treten lokalisierte Ladungen auf, die einen elektrophilen Angriff begünstigen. Je mehr dieser Rotationszentren vorhanden sind, desto mehr Reaktionen mit $^1\text{O}_2$ sind möglich.^[242] In CyIQ treffen also zwei positive Effekte zusammen: Eine kurze Methinkette und ein positiv geladener Heterocyclen ohne zusätzliche Heteroatome wie O, S oder Se. Für eine allgemeine Abschätzung der Photostabilität von Cyaninfarbstoffen sind die wichtigsten Einflüsse in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Zusammenfassung der wichtigsten positiven Einflüsse auf die Photostabilität von Cyaninfarbstoffen bei der Anwendung in wässrigen Medien nach aktuellem Ergebnis- und Literaturstand.

Ansatzpunkt	Effekt	Literatur
Heterocyclen	a) Indocarbocyanine sind wesentlich stabiler als Thia- oder Oxacarbocyanine	[31] S. 139 [249] S. 128,123
	b) Positiv geladene Heterocyclen sind stabiler als ungeladene Heterocyclen	[227] S. 101
	c) Polyfluorierung der Heterocyclen erhöht die Photostabilität	[244, 245]
	d) Elektronenziehende Nitro- oder Nitril-Gruppen an Heterocyclen verbessern die Photostabilität	[239]
Kettenlänge	Die Photostabilität nimmt mit steigender Länge der Polymethinbrücke ab (gültig ab Tri-Methin-Farbstoffen)	[228] S. 230 f., [238]
Substituierte Methinbrücke	a) Elektronenziehende Substituenten in der Polymethinbrücke verbessern die Photostabilität	[231, 235, 245]
	b) Rotationsfixierende Gruppen erniedrigen die Photoisomerisierung und verbessern die Photostabilität	[250] S. 18, [231, 251]
Anionen	Iodid als Gegen Ion zu positiv geladenen Heterocyclen erhöht die Stabilität	[247] S. 6529
Redoxpotentiale	Cyanine mit niedrigen Oxidationspotentialen reagieren nicht mit ihrer biologischen Umgebung ; keine Fluoreszenzlöschung	[215, 229]

4.3 Untersuchung von CyIQ-Monomeren

Die einfache Verknüpfung eines Fluorophors mit DNA ist der klassische Ansatz in bioanalytischen Methoden. In aller Regel wird er am 3'- oder 5'- Ende der DNA angebracht. Dabei dient der Fluorophor meist einzig dem Zweck der DNA-Visualisierung. Durch zielgerichtetes Molekül-Design versucht man heute, funktionelle DNA-Sonden zu entwickeln, mit denen es möglich ist, bestimmte Veränderungen in der DNA zu detektieren und damit das Leistungsspektrum einer DNA-Sonde zu erweitern. Vor allem unymmetrische Cyanin-Farbstoffe reagieren in ihren spektralen Eigenschaften besonders sensitiv auf ihre Umgebung.^[206, 252] Dies ist auch von CyIQ zu erwarten. Durch die enge Anbindung über die 2'- Position der Ribose soll der Fluorophor durch Interkalation in den Basenstapel oder Bindung in die Furche seine photophysikalischen Eigenschaften ändern. Im ersten Schritt werden daher die Eigenschaften von einfach CyIQ-modifizierten Oligomeren anhand unterschiedlicher Sequenzen im Einzel- und Doppelstrang untersucht. Im Fall der CyIQ-Monomere werden nur korrekt gepaarte Duplexe verwendet.



DNA2	3'- A-G-T-C-A-C-T-T- X -T-T-C-T-G-A-C-G - 5'
DNA2g	5'- T-C-A-G-T-G-A-A-A-A-A-G-A-C-T-G-C - 3'
DNA3	3'- A-G-T-C-A-C-T-C- X -C-T-C-T-G-A-C-G - 5'
DNA3g	5'- T-C-A-G-T-G-A-G-A-G-A-G-A-C-T-G-C - 3'
DNA4	3'- A-G-T-C-A-C-T-G- X -G-T-C-T-G-A-C-G - 5'
DNA4g	5'- T-C-A-G-T-G-A-C-A-C-A-G-A-C-T-G-C - 3'
DNA5	3'- A-G-T-C-A-G-A-T- X -T-A-G-T-G-A-C-T - 5'
DNA5g	5'- T-C-A-G-T-C-T-A-A-A-T-C-A-C-T-G-C - 3'
DNA6	3'- C-G-T-C-A-G-A-T-A- X -A-G-T-G-A-C-T - 5'
DNA6g	5'- G-C-T-G-T-C-T-A-T-A-T-C-A-C-T-G-A - 3'

Absorption

Die Absorptionsspektren der untersuchten Oligomere zeigen alle ein einheitliches Verhalten. Eine charakteristische Absorptionsbande der DNA bei $\lambda = 260$ nm im Einzel- sowie im Doppelstrang und die CylQ typischen Banden bei $\lambda = 325$ nm und 495 nm. Die zentrale Absorptionsbande bei 495 nm verhält sich in Form und Intensität in allen fünf untersuchten Sequenzen gleich und zeigt keine Veränderung zwischen Einzel- und Doppelstrang.

Fluoreszenz

Große Unterschiede finden sich in den Fluoreszenzspektren. Zunächst zeigen alle modifizierten Einzel- und auch Doppelstränge, angeregt bei $\lambda_{\text{exc}} = 495$ nm, Fluoreszenz im Bereich von $\lambda = 500 - 700$ nm mit jeweils einem Maximum bei $\lambda = (566 \pm 7)$ nm. Die Fluoreszenzintensität der Einzelstränge verhält sich dabei annähernd gleich. Die Fluoreszenzintensität der doppelsträngigen Oligomere weicht jedoch stark voneinander ab. Bei **DNA2**, **DNA3** und **DNA6** sind die Unterschiede zwischen Einzel- und Doppelstrang weniger ausgeprägt als bei **DNA4** und **DNA5**. Bei diesen beiden Strängen ist der Intensitätsunterschied besonders deutlich. Mit **DNA5** steigt die Fluoreszenz im Doppelstrang um das 1,7-fache an, wobei sie in **DNA4** um das 1,9-fache sinkt. Es finden offensichtlich Wechselwirkungen zwischen Fluorophor und DNA statt.

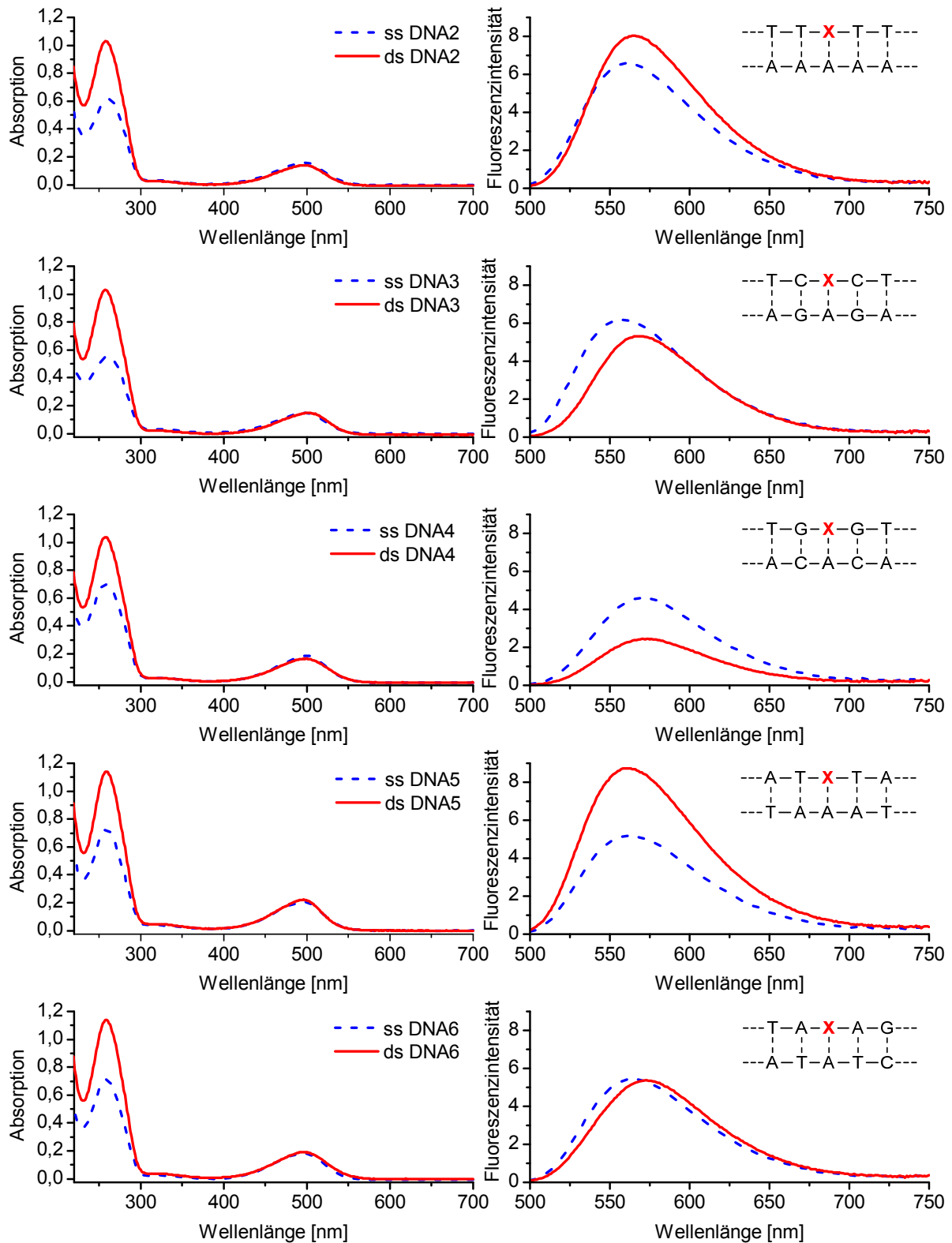


Abb. 40: Absorptionsspektren (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) von **DNA2-6** ($c = 2,5 \mu\text{M}$ in 10 mM NaP_i , pH7, 20 °C, mit $\text{NaCl } c = 250 \text{ mM}$, $\lambda_{\text{exc}} = 495 \text{ nm}$).

Betrachtet man die Sequenz von **DNA4** so, findet sich hier der Farbstoff zwischen zwei Guanin-Basen. Eine Fluoreszenzlöschung durch Guanin ist ein oft beobachtetes Phänomen bei Cyaninfarbstoffen, da Guanin am leichtesten aller DNA-Basen durch einen photoinduzierten Ladungstransfer oxidiert wird.^[31, 106, 215] Das scheint auch hier der Fall zu sein, was sich mit den Untersuchungen und Berechnungen deckt, die in Kapitel 4.2.2 Redoxeigenschaften bereits erarbeitet wurden. Über die Bestimmung der Redoxpotentiale im angeregten Zustand ergab sich eine Triebkraft von $\Delta G \approx -0,3 \text{ eV}$ für eine photoinduzierte Redoxreaktion zwischen CylQ* und Guanin. Zusätzlich ist in **DNA4** die Fluoreszenz des Doppelstrangs deutlich stärker gelöscht als diejenige im Einzelstrang. Scheinbar ist ein erfolgreicher Ladungstransfer erst durch die konformationelle Fixierung in doppelsträngiger DNA möglich. Ladungstransferreaktionen setzen eine effektive elektronische Kopplung voraus,^[253] die durch die doppelhelikale Struktur der DNA zustande kommt und somit die höhere Fluoreszenzlöschung im Doppelstrang erklärt.

In **DNA5** und **DNA2** ist der Fluoreszenzanstieg auch durch die Redox-eigenschaften zu erklären. Es befindet sich kein Guanin, welches seine Fluoreszenz löschen könnte, in direkter Nähe zum Farbstoff. Der Anstieg der Fluoreszenz im Doppelstrang ist durch die Fixierung der Rotation um die Polymethinbrücke zu erklären, wie bereits in Kapitel 4.2.1 näher beschrieben wurde. Der Fluoreszenzanstieg in **DNA5** und **DNA2** ist jedoch nicht annähernd so hoch wie im Titrationsexperiment, in dem der Farbstoff frei in Lösung vorlag. Die kovalente Verknüpfung über einen kurzen Linker bindet den Farbstoff offenbar so nahe an die DNA das es schon im Einzelstrang zu einer Einschränkung der Rotation und damit zu Fluoreszenz kommt. Intensive Wechselwirkungen zwischen Einzelstrang DNA und Fluorophoren sind nicht verwunderlich, wenn man sich den Strang als knäuel-artige Struktur vorstellt, an die sich ein Fluorophor gut anlagern kann. Derartige Wechselwirkungen konnten bereits in einer vorangegangenen Arbeit mit Cy3 beobachtet werden.^[25]

DNA3 und **DNA6** zeigen nahezu keinen Unterschied in der Fluoreszenzintensität zwischen Einzel- und Doppelstrang. In beiden Sequenzen befinden sich Guanin-Basen in unmittelbarer Nähe. Diese könnten über einen Ladungstransfermechanismus zur Fluoreszenzlöschung beitragen. Da nicht klar ist, ob CylQ in den Basenstapel ganz oder teilweise interkaliert, oder ob er in der kleinen

Furche der Doppelhelix lagert, ist auch eine Wechselwirkung des Fluorophors mit seiner unterschiedlichen Umgebung als Erklärung denkbar.

Tabelle 10: Fluoreszenzmaxima, Stokes-Verschiebung, Fluoreszenzquantenausbeuten, Extinktionskoeffizienten bei 495 nm, Helligkeit und Schmelztemperaturen von **DNA2-6**.

DNA	$\lambda_{\text{max/F}}$ [nm]	$\Delta\lambda_{\text{F vs. A}}$ [nm]	Φ_{F}	ϵ_{495} [L/mol·cm]	B	T_{m} [°C]
ssDNA2	562	67	0,08	63000	5000	-
dsDNA2	566	71	0,10	55000	5500	62,0
ssDNA3	559	64	0,08	59000	4700	-
dsDNA3	569	74	0,06	59000	3500	67,0
ssDNA4	570	75	0,03	74000	2200	-
dsDNA4	574	79	0,06	66000	4000	69,7
ssDNA5	562	67	0,07	83000	5800	-
dsDNA5	562	67	0,11	88000	9700	60,7
ssDNA6	566	71	0,07	73000	5100	-
dsDNA6	573	78	0,07	76000	5300	64,1

Durch die Redoxeigenschaften und die Beobachtungen in **DNA4** ist klar, dass CylQ Guanin oxidieren kann. Letztlich kann an dieser Stelle nicht geklärt werden, ob das unterschiedliche Fluoreszenzverhalten der anderen Sequenzen allein durch Quenching-Effekte oder durch induktive Wechselwirkungen zwischen CylQ und den unterschiedlichen Nukleobasen zustande kommt. Beides scheint eine Rolle zu spielen. Unsymmetrische Cyanine sind für ihre intensiven Wechselwirkungen mit DNA bekannt, und dies trifft auch für CylQ zu. Da es jedoch in keinem Fall zu einer kompletten Löschung der Fluoreszenz kommt, kann CylQ als Monomerer DNA-Marker verwendet werden. In Kombination mit der hervorragenden Photostabilität und der großen Stokes Verschiebung (75 nm) hat CylQ herausragende Eigenschaften die ihn zu einer interessanten Alternative zu Fluorescein, FAMTM, Atto[®] 495 bzw. 520, Alexa Fluor 500[®] und Thiazolorange macht.

4.4 Untersuchung von Interstrang Dimeren

Bei Interstrang-Dimeren sind sowohl Strang als auch Gegenstrang mit einem Fluorophor modifiziert. Handelt es sich jeweils um den gleichen Chromophor, so spricht man von „*Homodimeren*“. Zwei unterschiedliche Moleküle sind dagegen „*Heterodimere*“. Bei Interstrang Dimeren kommt durch die Wechselwirkung (z.B. FRET) der beiden Chromophore ein Fluoreszenzsignal zustande, das sich in seiner Intensität oder in seiner Qualität verändert. Da intermolekulare Wechselwirkungen distanzabhängig sind, kommen die gewünschten optischen Effekte erst bei Bildung oder Aufwinden eines DNA-Doppelstranges zustande oder z.B. bei einer Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung.

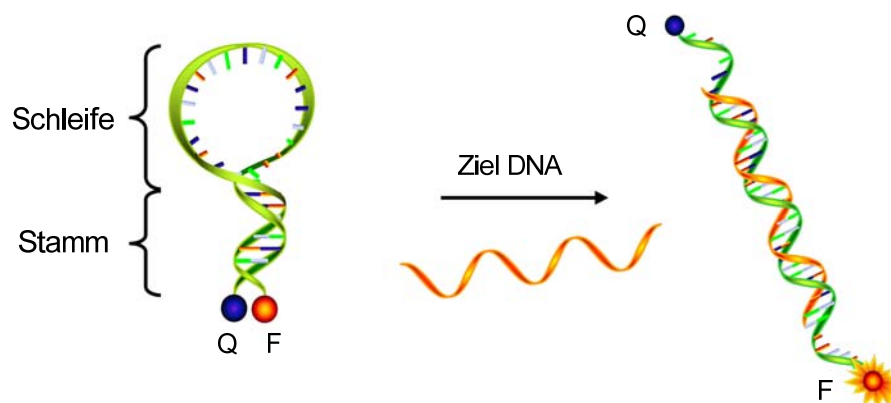


Abb. 41: *Molecular Beacons* bestehen aus zwei Teilen, Stamm und Schleife. Die DNA-Sequenz der Schleife ist komplementär zur Zielsequenz. Der Beacon-Stamm ist komplementär und ist in den klassischen Anwendungen mit einem Fluorophor (F) und dem passenden Quencher (Q) modifiziert (Abbildung aus ^[254, 255]).

Prädestiniert für eine solche Anwendung sind Hybridisierungssonden wie *Molecular Beacons*. Dabei handelt es sich um haarnadelähnliche Einzelstrang-DNA, die aus zwei Funktionseinheiten bestehen, dem Stamm und einer Schleife. Die Sequenz des Stammes ist antiparallel komplementär und verhält sich wie eine normale Doppelhelix. Die Schleife liegt offen vor und enthält die Zielsequenz. Wird ein komplementärer Gegenstrang (Ziel DNA) zugegeben, so öffnet sich der Beacon auf. *Molecular Beacons* haben sich zu hoch effektiven Standard-Sonden in der Molekularbiologie bei der Detektion und Quantifizierung von Ziel-DNA etabliert.^[255-258] Sie finden vor allem Anwendung in der „*Real-Time-PCR*“ (Echtzeit Polymerase-

kettenreaktion),^[259, 260] in der Microarray-Technologie^[260, 261] oder bei der zellulären Detektion von RNA.^[262] In den klassischen Ansätzen verwendet man ein Fluorophor-Quencher-Paar z.B. aus Fluorescein und dem universellen Fluoreszenz-Löcher (Quencher) Dabcyl.^[263] Durch die räumliche Nähe in einem geschlossenen Beacon ist die Fluoreszenz gelöscht. Wird eine Ziel-DNA erkannt, so öffnet sich der Beacon, die Fluorophore trennen sich und ein Fluoreszenzsignal entsteht. Die Verbesserung hinsichtlich Sensitivität und Spezifität der Fluorophore ist Gegenstand aktueller Forschung. Die Arbeitsgruppe *Wagenknecht* konnte bereits einen neuartigen Molecular-Beacon entwickeln, der während des Aufwindens seine Farbe ändert.^[24] Er basiert auf einer Hetero-Dimer Anordnung aus Thiazolorange und Thiazolrot innerhalb der Stamm-Sequenz (*in-stem Molecular Beacon*). In den folgenden Experimenten soll das Verhalten von CylQ in Interstrang-Dimeren untersucht werden. Ziel ist es, eine potentielle Chromophor-Kombination für Molecular-Beacons zu finden. Daher werden zunächst nur die Stamm-Einheiten eines *Molecular Beacons* untersucht, weshalb in dieser Arbeit *Molecular Beacons* im Kapitel „Interstrang-Dimere“ beschrieben werden.

4.4.1 Homodimere

Anders als bei den Heterodimeren liegen bei den Homodimeren zwei identische Moleküle vor, die miteinander in Wechselwirkung treten. Voraussetzung ist auch hier räumliche Nähe, die durch die Ausbildung der DNA-Doppelhelix erzwungen wird. Die beiden CylQ-Chromophore werden jeweils um eine Base zueinander versetzt angeordnet, um eine möglichst effektive Interaktion zu gewährleisten. Da die Untersuchungen bei den CylQ-Monomeren eine Fluoreszenzlöschung durch eine Guanin-Oxidation ergaben, wird eine A-T-Umgebung bevorzugt. Homodimere stellen die kleinste Form eines Aggregates dar. Die Aggregation von Cyaninen in wässriger Lösung ist ein bekannter Prozess,^[28] wobei hier eine undefinierte Anzahl von Molekülen aggregiert. In Verbindung mit DNA wird jedoch die Aggregation durch die Anordnung in der Doppelhelix so determiniert, dass es sich bei den untersuchten Zuständen immer um Dimere handeln sollte.^[23] Cyanin-Dimere können sowohl Wechselwirkungen im Grundzustand (Exciton) als auch im photoangeregten Zustand, wie z.B. Excimer, zeigen. Die Hintergründe hierzu wurden bereits in

Kapitel 3.3 erläutert. Die Ausbildung von excitonischen Wechselwirkungen oder Grundzustandswechselwirkungen können hoch interessante photophysikalische Eigenschaften hervorrufen, die man sich in der Bioanalytik zu Nutze machen kann, was anhand von **DNA7-10** für CylQ in einer Interstranganordnung untersucht werden soll.

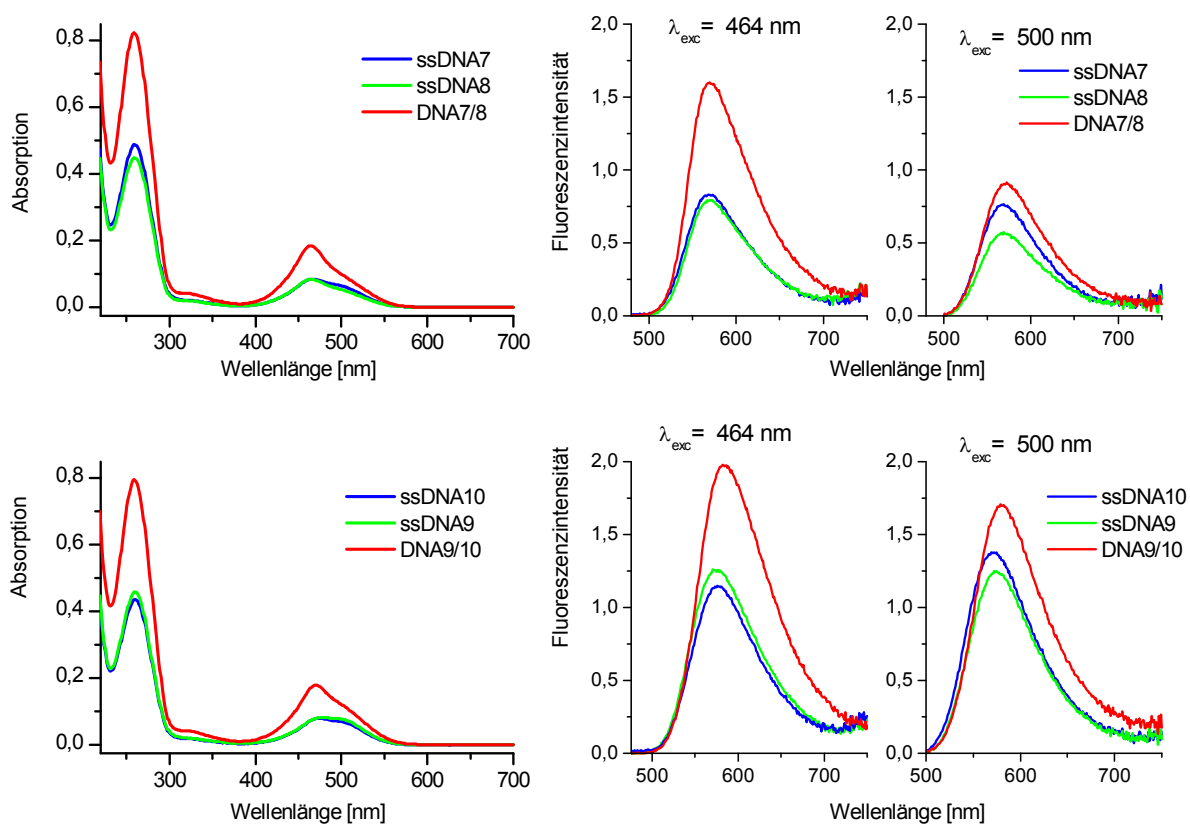
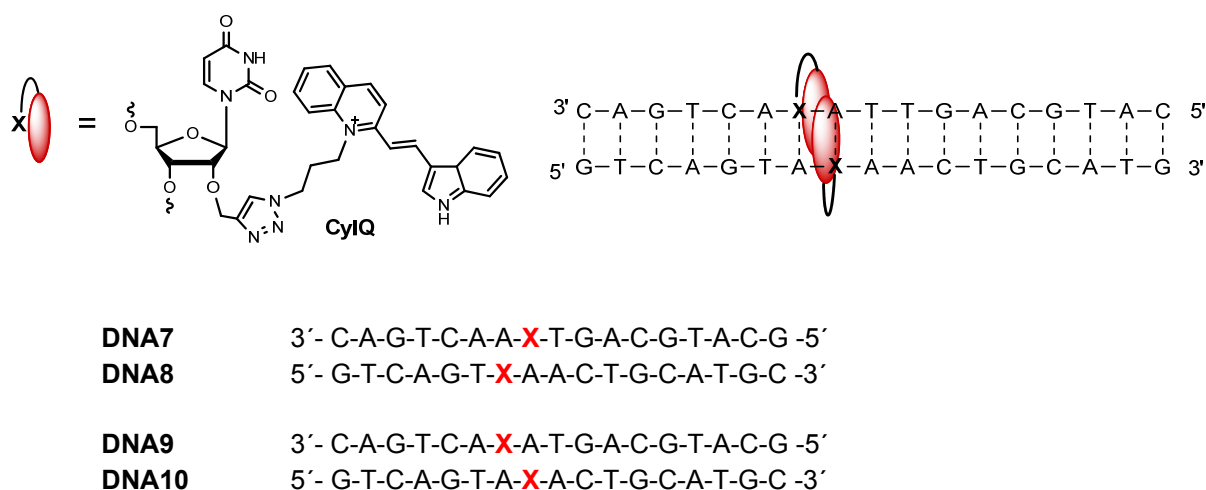


Abb. 42: Absorptionsspektren (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) von **DNA7-10** ($c = 2,5 \mu\text{M}$ in 10 mM NaPi, pH 7, 20 °C, mit NaCl $c = 250 \text{ mM}$, $\lambda_{\text{exc}} = 464$ und 500 nm s. Fluoreszenzspektren).

Vergleicht man die Absorptionsspektren von **DNA7-10** mit denen der CylQ-Monomere in **DNA2-6**, so wird auf den ersten Blick die Veränderung der Absorptionsbande zwischen $\lambda = 400$ und 550 nm deutlich. Bei den DNA-Monomeren liegt das Maximum dieser Absorptionsbande bei 495 nm. Bei den Dimeren ist das Maximum um 30 nm hypsochrom verschoben und liegt bei 465 nm. Dabei ändert sich auch die Symmetrie der gesamten Absorptionsbande. Besonders ausgeprägt zeigt sich die Verschiebung in den Doppelsträngen (**DNA7/8** und **DNA9/10**). Bei genauerem Blick fällt eine Feinstruktur in Form einer Schulter bei 500 nm auf. In den Einzelsträngen, vor allem bei **DNA9** und **DNA10**, ist sie stärker ausgeprägt. Diese Schulter entspricht dem Absorptionsmaximum der CylQ-Monomere. Die Spektren deuten drauf hin, dass CylQ-Dimere excitonische Wechselwirkungen unter Ausbildung eines veränderten Absorptionsmaximums eingehen. Dieser Effekt wurde bereits vielfach bei anderen Cyaninfarbstoffen beobachtet.^[94, 204, 264, 265] Dort wurde der Effekt hauptsächlich bei der Aggregation in wässrigen Lösungen beschrieben. Eine Verschiebung des Absorptionsmaximums zu niedrigeren Wellenlängen weist bei der Bildung von Dimeren auf H-Aggregate oder Excimere hin.^[28, 86, 89, 204] Diese Beobachtungen wurden in unserer Forschungsgruppe bereits an Interstrang-Dimeren mit Thiazolorange gemacht.^[23, 102] Auch hier zeigte sich eine hypsochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums bei Dimer-Bildung. Weshalb sich in den hier untersuchten Strängen **DNA7-10** bereits im Einzelstrang eine Änderung in der Absorption zeigt, war zunächst nicht klar. Bei Interstrang-Dimeren aus Thiazolorange ist dies nicht der Fall.

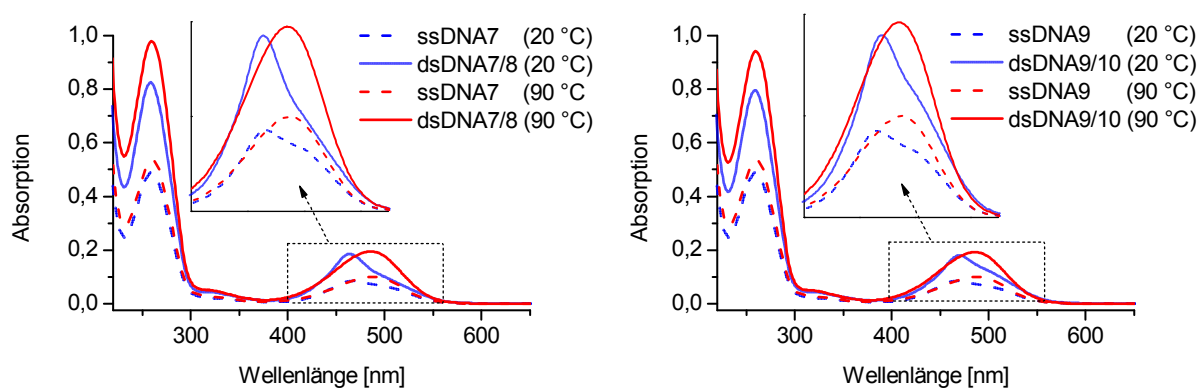


Abb. 43: Absorptionsspektren bei 20 °C und 90 °C von DNA7/8, DNA9/10 und den jeweiligen Einzelsträngen ($c = 2,5$ μ M in 10 mM NaPi, pH 7, mit NaCl $c = 250$ mM). Die Vergrößerungen zeigen den Absorptionsbereich von CylQ ($\lambda = 400 - 575$ nm).

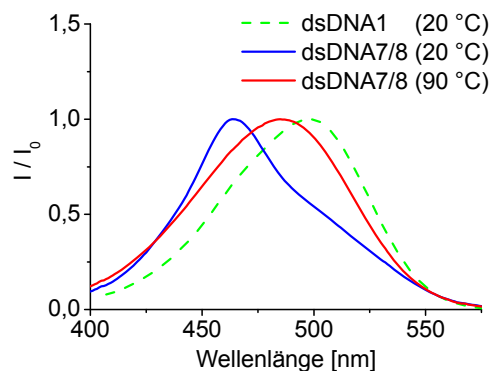


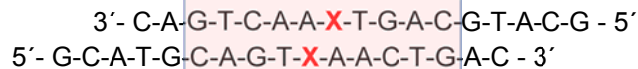
Abb. 44: Vergleich der Absorptionsspektren von CylQ-Monomer (DNA1) und Interstrangdimer (DNA7/8).

Um sicher zu stellen, dass es sich bei dem beobachteten Absorptionsverhalten tatsächlich um DNA-determinierte Aggregate handelt und nicht um eine sequenzspezifische Wechselwirkung, wurden Absorptionsspektren bei 20 °C und bei 90 °C aufgenommen. Bei 90 °C sollte der DNA-Strang vollständig dehybridisiert vorliegen und die CylQ-Aggregation aufgehoben sein. Genau das ist auch zu beobachten. Man sieht bei 90 °C deutlich, dass die Absorptions-

bande der eines CylQ-Monomers gleicht (s. **Abb. 44**). Zusätzlich wurden Schmelztemperatur-messungen bei $\lambda = 500$ nm aufgenommen, da sich hier die Absorption bei der Dimer-Bildung deutlich ändert, was in den Schmelzkurven auch schön zu sehen ist. Die Schmelzpunkte bei 500 nm stimmen mit denen bei 260 nm überein.

Es bilden sich also eindeutig DNA-vermittelte CylQ Dimere. Woher kommt dann die Wechselwirkung in den Einzelsträngen? Die Antwort liegt in der verwendeten DNA-Sequenz. Bei genauer Betrachtung wird deutlich, dass diese über einen zusammenhängenden Bereich von 10 Basen selbstkomplementär ist (s. **Abb. 45**). Das reicht für eine stabile Duplexbildung und somit zu einer Bildung von Dimeren in allen Einzelsträngen (**DNA7-10**). Schmelztemperaturmessungen ergeben für die Einzelstränge einen durchschnittlichen Schmelzpunkt von 41 °C. Die verwendete DNA-Sequenz wurde aus den Arbeiten mit Thiazolorange und Thiazolrot abgeleitet, um die Ergebnisse vergleichen zu können. Wieso der Effekt dort nicht auftritt, hat zwei Gründe. Zum einen wird der Farbstoff in diesen Arbeiten über einen acyclischen, nicht-nukleosidischen Linker verknüpft, der nicht wie das Uridin zur Basenpaarung beiträgt. Zum zweiten haben sowohl Thiazolorange als auch Thiazolrot eine deutlich kürzere Polymethinkette. Die Stabilität von Dimeren steigt aber mit zunehmender Kettenlänge stark an, was einen bekräftigenden Einfluss auf die Bildung von Dimeren hat.^[204]

DNA7
DNA7



Sowohl in den Einzelsträngen von **DNA7-10** als auch in den Doppelsträngen **DNA7/8** und **DNA9/10** ist eine relativ intensive Fluoreszenz zwischen $\lambda = 500$ und 700 nm zu beobachten (s. **Abb. 42**). Die Maxima liegen dabei für **DNA7/8** bei $\lambda = 570$ nm und für **DNA9/10** bei $\lambda = 582$ nm das somit im Vergleich zum Monomer ($\lambda = 566$ nm) um 16 nm rotverschoben ist. Allgemein ist die Fluoreszenzintensität deutlich geringer als bei den Einfacheinbauten. Wird die Fluoreszenz bei der Monomertypischen Absorption ($\lambda = 495$ nm) angeregt, so ist kein relevanter Intensitätsunterschied in der Fluoreszenz festzustellen. Interessanterweise fluoresziert **DNA9/10** hierbei doppelt so stark wie **DNA7/8**. Bei Anregung im neu gebildeten Absorptionsmaximum bei $\lambda = 464$ nm ist die Fluoreszenz des Doppelstranges deutlich höher als die der Einzelstränge, was aufgrund des nahezu doppelten Extinktionskoeffizienten bei 464 nm aber nicht überrascht. Die Fluoreszenzintensität in **DNA7/8** ist allgemein niedriger als in **DNA9/10**.

Fügt man die Ergebnisse der Absorptions- und Fluoreszenzmessungen an dieser Stelle zusammen, so ergibt sich kein klares Bild. Zunächst fallen die deutlichen excitonischen Wechselwirkungen in den Absorptionsspektren auf. Diese sind nach der Exciton-Kopplungstheorie von *Kasha* (vgl. Kapitel 3.3) durch Ausbildung von H-Aggregaten zu erklären. Bei H-Aggregaten erfolgt die Anregung in das energetisch höhere Exciton-Niveau der Davydov-Aufspaltung was sich in der hypsochromen Verschiebung der Absorptionsmaxima zeigt. Eine Emission aus diesem Energieniveau ist theoretisch verboten. In **DNA7/8** scheint das zu einem gewissen Teil auch der Fall zu sein, die Fluoreszenzintensität ist deutlich geringer als bei den Monomeren. In **DNA9/10** ist die Fluoreszenz jedoch intensiver und zusätzlich um 15 nm bathochrom verschoben. Ein ähnliches Phänomen konnte bei den bereits erwähnten Thiazolorange-Dimeren beobachtet werden wo die Stokes-Verschiebung noch größer war.^[102] Dort zeigte sich eine vergleichbare Verschiebung des Absorptionsspektrums wobei jedoch eine zusätzliche Bande bei niedrigeren Wellenlängen beobachtet wurde. Durch zeitaufgelöste transiente Absorptions-

spektroskopie konnte gezeigt werden, dass es sich in diesem Fall um fluoreszente H-Aggregate und nicht um Excimere wie zunächst angenommen handelte. In den Absorptionsspektren von **DNA7/8** und **9/10** ist jedoch keine zusätzliche Bande zu erkennen. Möglicherweise liegen hier Subensembles vor, die sowohl monomerer als auch dimerer Form sind und dadurch unterschiedliche Wechselwirkungen hervorrufen. Denkbar ist eine Koexistenz von emittierenden Monomeren, gelöschten H-Aggregaten und excimerartiger Fluoreszenz. Um dies genauer zu untersuchen wurden temperaturabhängige Fluoreszenzspektren aufgenommen um die CylQ-Dimere durch Dehybridisierung der DNA zu trennen. Zusätzlich wurden Anregungsspektren aufgenommen.

Bei den Temperaturabhängigen Messungen geht die Fluoreszenzintensität mit steigender Temperatur kontinuierlich zurück. Dafür ist die Zunahme von Vibrations- und Rotationszuständen bei höheren Temperaturen verantwortlich, die für eine strahlungslose Desaktivierung der angeregten Zustände sorgen. Die Spektren zeigen jedoch ganz deutlich, dass sich die Lage des Fluoreszenzmaximums beim Aufwinden der DNA-Doppelhelix verändert. Es verschiebt sich mit steigender Temperatur in Richtung der Monomer-Fluoreszenz (**DNA1**) zu niedrigeren Wellenlängen. Das stimmt mit den Ergebnissen überein, die bei gleicher Anordnung für Thiazolorange beobachtet wurden.^[23] Diese Verschiebung in der Fluoreszenz ist später bei den Intrastrang Dimeren von CylQ (vgl. 4.5.2, **Abb. 61**) nicht mehr zu beobachten. Dort bilden sich gelöschte H-Aggregate, die beim Aufwinden auseinander gehen und monomertypische Fluoreszenz zeigen. Dieser Vorgang wird dort noch genauer behandelt.

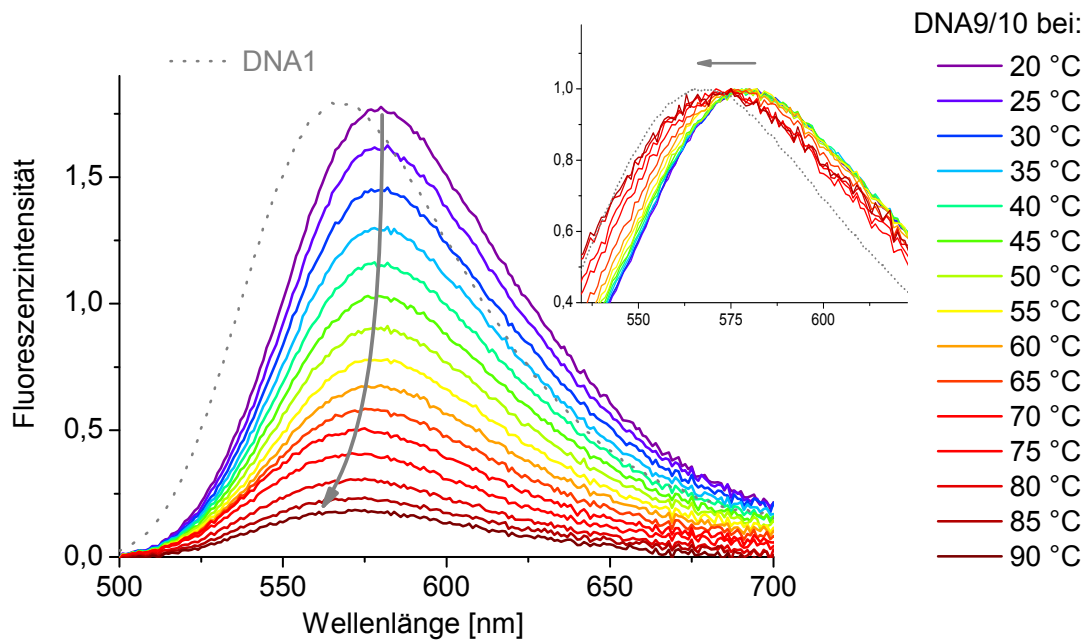


Abb. 46: Temperaturabhängiges Fluoreszenzspektrum von **DNA9/10** im Vergleich zum CylQ-Monomer **DNA1**. Das kleinere eingefügte Spektrum zeigt die normierte Fluoreszenz ($c = 2,5 \mu\text{M}$ in 10 mM NaPi, pH 7, mit NaCl $c = 250 \text{ mM}$, $\lambda_{\text{exc}} = 495 \text{ nm}$).

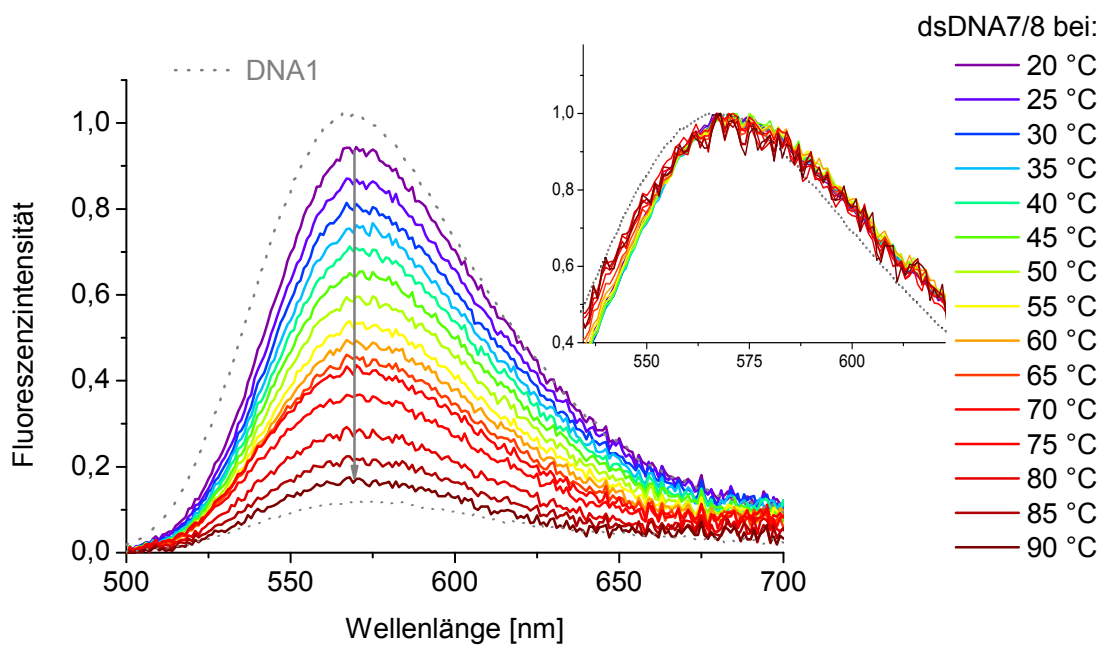


Abb. 47: Temperaturabhängiges Fluoreszenzspektrum von **DNA7/8** im Vergleich zum CylQ-Monomer **DNA1**. Das kleinere eingefügte Spektrum zeigt die normierte Fluoreszenz ($c = 2,5 \mu\text{M}$ in 10 mM NaPi, pH 7, mit NaCl $c = 250 \text{ mM}$, $\lambda_{\text{exc}} = 495 \text{ nm}$).

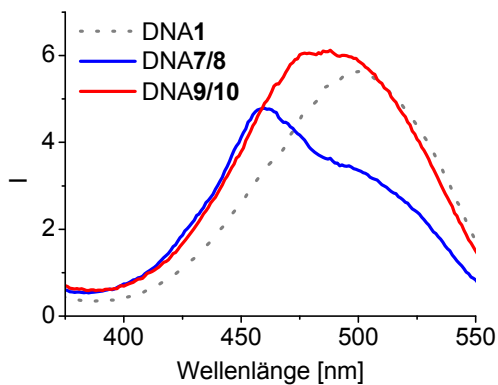


Abb. 48: Anregungsspektren von DNA1 (bei $F_{\max} = 566 \text{ nm}$), DNA7/8 (bei $F_{\max} = 570 \text{ nm}$) und DNA 9/10 (bei $F_{\max} = 582 \text{ nm}$).

Beim Blick in die Anregungsspektren (vgl. **Abb. 48**) wird ein weiterer Unterschied zwischen **DNA7/8** und **DNA9/10** deutlich. Die Form des Spektrums in **DNA7/8** gleicht dem des aggregierten Dimers. Die Bande von **DNA9/10** ist sehr breit und scheint, verglichen mit **DNA1**, sowohl Monomer- als auch Dimer-Anteile aufzuweisen. Eine klare Abgrenzung der Mechanismen scheint nicht möglich. In **DNA7/8** scheint eine Fluoreszenzlöschung durch H-Aggregate zu dominieren,

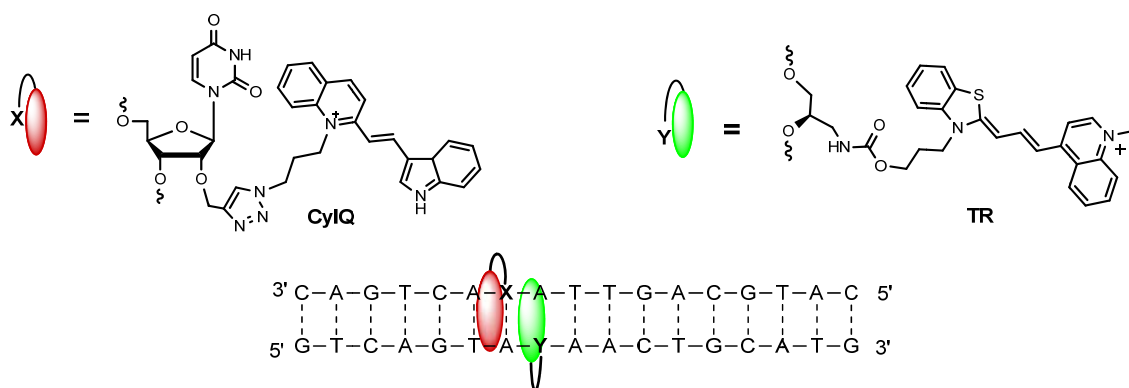
was aus der geringen Fluoreszenzintensität und den Anregungsspektren hervorgeht. In **DNA9/10** scheint aber zu einem gewissen Teil excimerartige Fluoreszenz zu entstehen. Ob es sich hierbei wie bei den Thiazoldimeren um fluoreszente H-Aggregate handelt könnte durch zeitaufgelöste Emissionsspektren geklärt werden. Trotzdem scheint auch bei **DNA9/10** zu gewissen Teilen Fluoreszenzlöschung vorzuliegen.

Dieses unklare Bild ist in einem dynamischen System wie der DNA nicht ungewöhnlich. Es ist nicht davon auszugehen, dass alle CylQ-Moleküle einheitlich in Wechselwirkung treten sondern vielmehr durch das Vorliegen von Subensembles gleichzeitig unterschiedliche Wechselwirkungen ausbilden. Sind die Möglichkeiten zur Bildung solcher Subensembles vielfältig, so wird keiner der photophysikalischen Prozesse dominieren.

Die Wahl der DNA-Sequenz ist für diese Untersuchungen nicht optimal. Es wird aber grundsätzlich deutlich, dass sich CylQ-Dimere in einer Interstranganordnung nicht für *Molecular-Beacons* eignen. Es ist weder ein nennenswerter Fluoreszenzanstieg zu beobachten, was im Vergleich zu den Monomeren in **DNA1-6** deutlich wird, noch ändert sich die Lage und somit die Farbe des Fluoreszenzmaximums in einer relevanten Weise. Erschwerend kommt hinzu, dass sich die excitonischen Wechselwirkungen in unvorhersehbarer Weise ändern und in Mischformen vorliegen. Die Untersuchungen liefern dennoch wichtige Informationen über die Wechselwirkung von CylQ-Dimeren.

4.4.2 Heterodimere (FRET von CylQ auf Thiazolrot)

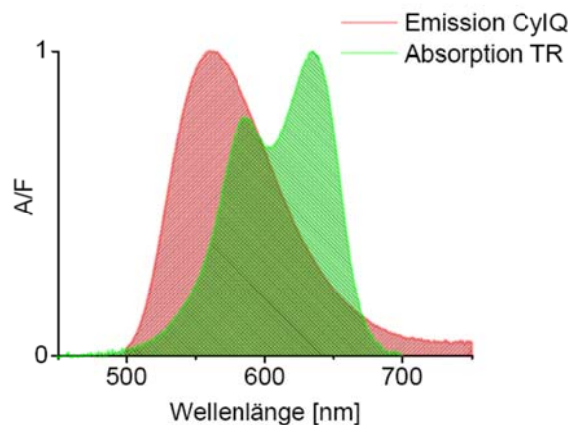
Für die Synthese von FRET-DNA-Sonden mit Thiazolrot und CylQ wurden erstmals zwei Modifikationsmöglichkeiten für Farbstoffe in einem Oligomer vereint. Zum einen der direkte Einbau des Thiazolrot-Phosphoramidit und zum anderen der postsynthetische Einbau von CylQ an ein Klick-Uridin, das zusammen mit dem Thiazolrot während der DNA-Synthese eingebaut wurde (s. unten). Thiazolrot wird hierbei über einen azyklischen Phosphoramidit-Linker verknüpft.^[266] Werden die Sonderbausteine direkt hintereinander angeordnet, so liegt später keine Base zwischen den beiden Chromophoren. Durch diese räumliche Nähe soll eine hohe FRET-Effizienz erreicht werden.



DNA11	3'-C-A-G-T-C-A-A-Y-T-G-A-C-G-T-A-C-G-5'
DNA8	5'-G-T-C-A-G-T-X-A-A-C-T-G-C-A-T-G-C-3'
DNA7	3'-C-A-G-T-C-A-A-X-T-G-A-C-G-T-A-C-G-5'
DNA12	5'-G-T-C-A-G-T-Y-A-A-C-T-G-C-A-T-G-C-3'
DNA13	3'-C-A-G-T-C-A-Y-A-T-G-A-C-G-T-A-C-G-5'
DNA10	5'-G-T-C-A-G-T-A-X-A-C-T-G-C-A-T-G-C-3'
DNA9	3'-C-A-G-T-C-A-X-A-T-G-A-C-G-T-A-C-G-5'
DNA14	5'-G-T-C-A-G-T-A-Y-A-C-T-G-C-A-T-G-C-3'

Anders als bei den Homodimeren, liegen bei den Heterodimeren zwei unterschiedliche Moleküle (CylQ und TR) vor die miteinander in Wechselwirkung treten. Die Voraussetzung ist auch hier räumliche Nähe, die durch die Ausbildung

der DNA-Doppelhelix zustande kommt. Die typische Wechselwirkung zweier unterschiedlicher Fluorophore ist ein FRET (*Förster-Resonanzenergietransfer*).^[267]



Abb, 49: Kombiniertes Absorptions- und Fluoreszenzspektrum von CylQ und TR. Für einen effizienten FRET müssen sich beide in großen Teilen überlagern.

Damit ein solcher Energietransfer zustande kommt, muss die Absorption des einen Farbstoffs (Akzeptor) mit der Emission des anderen Farbstoffs (Donor) überlappen.^[268] Diese Grundvoraussetzung ist zwischen CylQ und Thiazolrot gegeben. Bei Betrachtung des kombinierten Spektrums wird die Überlappung deutlich, die Emission von CylQ überschneidet die Absorption von Thiazolrot (vgl. **Abb, 49**). Thiazolrot kann somit durch die Emission von

CylQ angeregt werden und selbst eine Sekundäremission zeigen. Eine Kombination von CylQ und Thiazolrot ist von besonderem Interesse, da die Kombination aus Thiazolorange, das ebenfalls bei ca. 500 nm absorbiert, und Thiazolrot ein gutes FRET-System bilden. Diese Kombination ist zusätzlich in der Lage die Farbe zu ändern.^[24] Da die Effizienz eines Energietransfers von der Orientierung der beiden Fluorophore zueinander abhängt, werden alle vier möglichen Orientierungen aus **DNA7-14** untersucht.

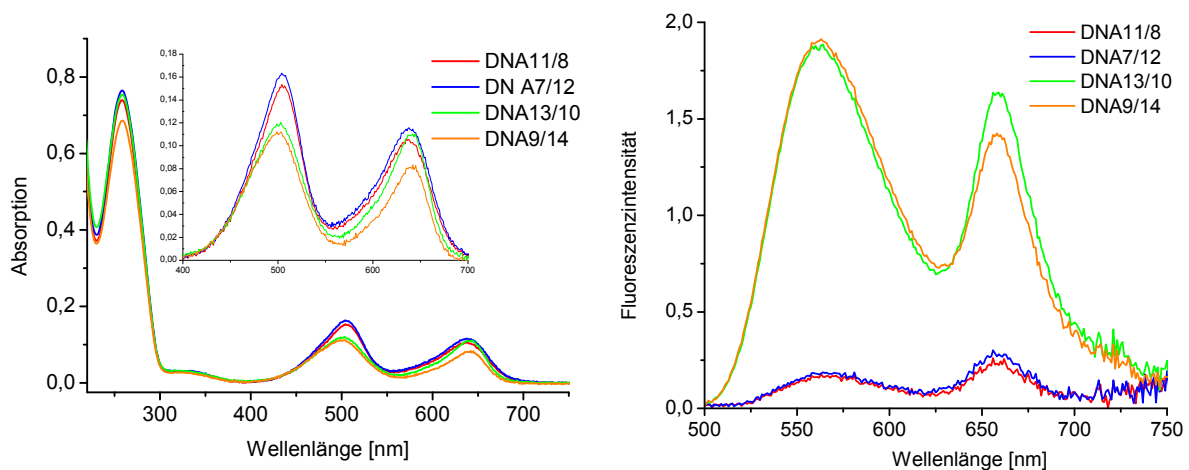


Abbildung 50: Absorptions- und Fluoreszenzspektren der doppelsträngigen Oligonukleotide **DNA11/8**, **DNA7/12**, **DNA13/10** und **DNA9/14** ($c = 2,5 \mu\text{M}$ in 10 mM NaPi , $\text{pH } 7$, 20°C , mit $\text{NaCl } c = 250 \text{ mM}$, $\lambda_{\text{exc}} = 495 \text{ nm}$).

Die Absorptionsspektren aller vier Duplexe **DNA11/8**, **DNA7/12**, **DNA13/10** und **DNA9/14** zeigen die beiden typischen Absorptionsbanden von CylQ und Thiazolrot. CylQ weist eine typische Monomer-Bandenform auf mit einem Maximum bei $\lambda_{\text{max/CylQ}} = 495 \text{ nm}$. Die Thiazolrot typische Absorption weist ein Maximum bei $\lambda_{\text{max/TR}} = 640 \text{ nm}$. Die beiden Maxima sind gut voneinander getrennt, was verhindert dass bei Anregung des FRET-Donors (CylQ) auch der FRET Akzeptor (TR) mit angeregt wird. Bei genauerer Betrachtung sind Intensitätsunterschiede vor allem in der CylQ-Bande zu erkennen. **DNA11/8** und **DNA7/12** haben bei 495 nm eine höhere Absorption als **DNA13/10** und **DNA9/14**. Die Absorption von Thiazolrot verhält sich gleich. Da sich diese Stränge in ihrer Orientierung unterscheiden, wird der Effekt auf Grundzustandswechselwirkungen zurückgeführt, die sich bei unterschiedlicher Orientierung ausbilden.

Alle vier Duplexe zeigen jeweils zwei Fluoreszenzbanden zwischen 500 und 700 nm (vgl. Abbildung 50) bei Anregung im Absorptionsmaximum von CylQ (495 nm). Die kurzwellige Fluoreszenzbande mit einem Maximum bei $\lambda_{\text{max}} = 563 \text{ nm}$ stammt von CylQ. Die längerwellige zweite Bande bei $\lambda_{\text{max}} = 658 \text{ nm}$ stammt von Thiazolrot. Ein Energietransfer von CylQ auf Thiazolrot wird somit in allen Strängen beobachtet, da eine singuläre Emission von Thiazolrot bei dieser Anregungswellenlänge nicht erfolgt. Der Intensitätsunterschied ist jedoch enorm. **DNA13/10** und **DNA9/14** zeigen eine intensive Fluoreszenz, wohingegen **DNA11/8**

und **DNA7/12** nur sehr schwach fluoreszieren. Bildet man die Verhältnisse zwischen den Fluoreszenzintensitäten der beiden Chromophore, so wird die Effizienz des FRET deutlich. Bei Werten über eins dominiert die Intensität der Akzeptor-Emission, in diesem Fall die von Thiazolrot (vgl. Tabelle 11). In Abbildung 50 sind nur die Doppelstränge abgebildet. Die detaillierten Fluoreszenzspektren der einzelnen Oligomere sind in **Abb. 51** dargestellt. Hier wird auch deutlich, dass die unterschiedliche Orientierung der Fluorophore zueinander den entscheidenden Einfluss auf das optische Verhalten liefert. In den Strängen **DNA11/8** und **DNA7/12** ist die Fluoreszenzintensität des FRETs und die des CylQ-Einzelstranges etwa ähnlich gering. Regt man TR gesondert an, so ist dessen Fluoreszenz so intensiv, das mit einer höheren Filtereinstellung am Fluoreszenzspektrometer gearbeitet werden musste. Dadurch wird deutlich, dass zwar in diesen beiden Strängen ein FRET möglich ist, dieser aber so schwach luminesziert, dass er für die Praxis untauglich ist.

Tabelle 11: Optische Daten zu **DNA11/8**, **7/12**, **13/10** und **9/14**. Fluoreszenzmaxima von FRET Donor (CylQ) und FRET Akzeptor (TR) sowie die Verhältnisse der Fluoreszenzintensität (FI) im jeweiligen Maximum.

DNA	$\lambda_{\text{max/F CylQ}}$ [nm]	$\lambda_{\text{max/F TR}}$ [nm]	$FI_{\text{TR}}/FI_{\text{CylQ}}$
DNA11/8	563	658	1,3
DNA7/12	563	658	1,5
DNA13/10	563	658	0,9
DNA9/14	563	658	0,7

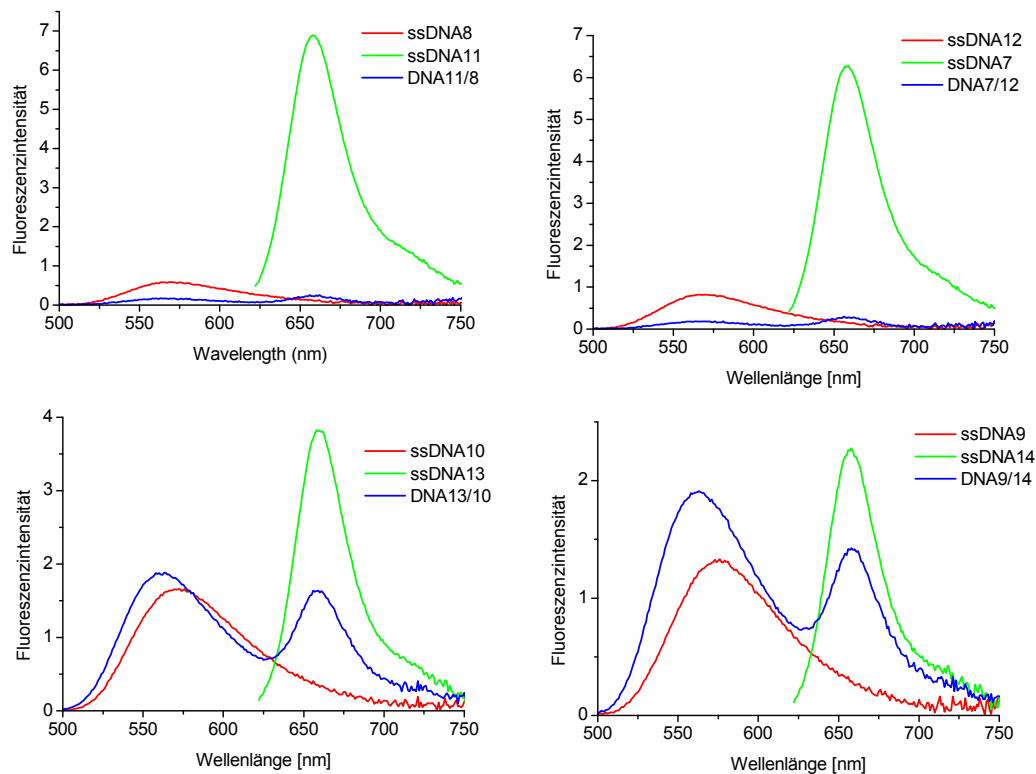


Abb. 51: Fluoreszenzspektren der vier DNA-Systeme mit unterschiedlicher Orientierung der Fluorophore ($c = 2,5 \mu\text{M}$ in 10 mM NaPi, pH 7, 20°C , mit NaCl $c = 250 \text{ mM}$, $\lambda_{\text{exc}} = 495 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{exc}} = 640 \text{ nm}$ bei ssDNA7, ssDNA11, ssDNA13 und ssDNA14).

Anders verhält es sich bei den Strängen **DNA13/10** und **DNA9/14**. Hier ist die Intensität um das Sechs- bis Zehnfache höher. Möglicherweise treten hier zwei Mechanismen in Konkurrenz. Betrachtet man die Sequenzen und die Verknüpfung der Chromophore, so wird deutlich, dass in **DNA13/10** und **DNA9/14** jeweils ein A/U-Basenpaar zwischen Donor und Akzeptor liegen. Bei **DNA11/8** und **DNA7/12** liegen CylQ und TR direkt nebeneinander, sind also räumlich nicht getrennt. In diesem Fall kann es zu Aggregation oder Orbitalüberlappung zwischen Donor und Akzeptor kommen. Deshalb kann neben dem Förster-Energietransfer auch ein gewisser Anteil an statischer Fluoreszenzlöschung durch Aggregation vorliegen.^[269] Bei ausgeprägten Aggregaten (H-Aggregate) sollte sich dies zusätzlich durch eine hypsochrome Verschiebung im Absorptionsspektrum zeigen, was aber hier nicht der Fall ist. Bei **DNA13/10** und **DNA9/14** ist der Abstand zwischen Donor und Akzeptor

am größten. Hier scheint der Förster-Energietransfer zu dominieren, was sich in der höheren Fluoreszenzintensität zeigt.

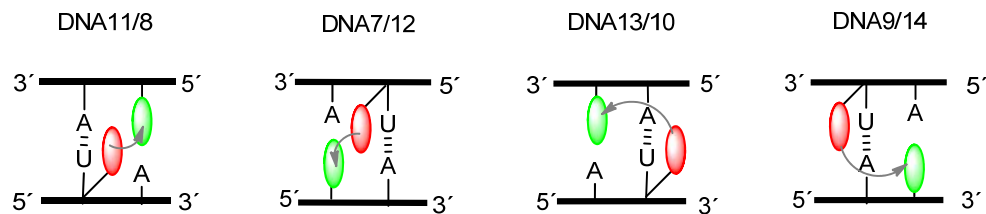


Abb. 52: Schematische Darstellung der Distanz zwischen Donor (CylQ = rot) und Akzeptor (TR = grün). In **DNA11/8** und **DNA7/12** kann durch räumliche Nähe auch statische Fluoreszenzlöschung durch Aggregation auftreten. In **DNA13/10** und **DNA9/14** ist die FRET-Fluoreszenz am intensivsten.

Besonders effektiv ist offensichtlich die Anordnung der Chromophore in **DNA9/14**. In allen Fällen ist jedoch der FRET nicht vollständig. Die Fluoreszenz von CylQ ist in allen Fällen noch sehr intensiv. Bei einem perfekten FRET-System sollte die Energie des FRET-Donors komplett auf den Akzeptor übergehen und keine Emission mehr zeigen.

4.5 Untersuchung von Intrastrang-Dimeren



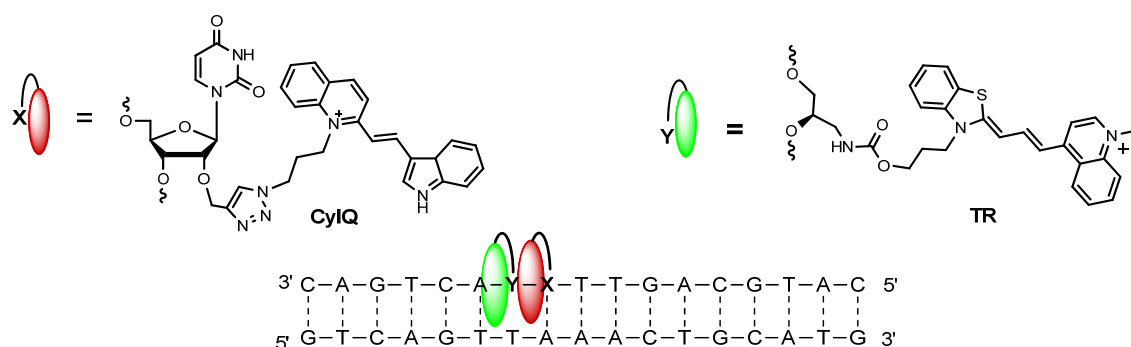
Abb. 53: Illustration von Intrastrang DNA-Sonden. (Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit.^[105] Copyright Wiley- VCH 2008).

Bei Intrastrangdimeren sind die beiden wechselwirkenden Fluorophore in einem Oligomer verknüpft. Dieser Ansatz hat den großen Vorteil, dass Ziel-DNA oder Ziel-Strukturen ohne weitere Modifikation detektiert werden können, vorausgesetzt die beiden Fluorophore liefern durch ihre Interaktion ein veränderliches Signal. Dadurch stellen Intrastrangdimere wortwörtlich „funktionelle DNA-Sonden“ dar, also Sonden, die erst nach Bindung an

ihre Ziel-Struktur ein Signal liefern. Man spricht auch von „On-Off“-DNA-Sonden,^[105] da sie wie ein Lichtschalter funktionieren. Auf diese Weise könnten z. B. in der Fluoreszenzmikroskopie Zielstrukturen durch die selektive DNA-Sequenz lokalisiert und durch Fluoreszenzänderung visualisiert werden.^[104] Auf fester Phase wie z.B. in der DNA-Microarraytechnologie könnten derartige Sonden die Hybridisierung von unmodifizierter Ziel-DNA anzeigen. Bei entsprechender Empfindlichkeit würde das übliche Amplifizieren, Modifizieren und Waschen von cDNA wegfallen. Im Hinblick auf strukturell bedingte Wechselwirkungen der Sonde mit einer Ziel-DNA könnten auch DNA-Schäden wie Punktmutationen detektiert werden.^[270] So kann das Leistungsspektrum von Sensoren und Sonden verbessert und erweitert werden. Im Vergleich zu *Molecular-Beacons* können Intrastrang-Dimere in sehr kurze DNA-Sequenzen eingebaut werden und benötigen keine Stamm-Region, die für die Zielerkennung unnötig und störend ist. Ziel der folgenden Untersuchungen ist es, eine auf CylQ basierende DNA-Sonde zu entwickeln, welche für bioanalytische Zwecke verwendet werden kann.

4.5.1 Heterodimere (FRET von CylQ auf Thiazolrot)

Bei dieser Art von DNA Sonden wird, wie bei den Interstrang Sonden, CylQ als FRET–Donor mit Thiazolrot als FRET-Akzeptor kombiniert. In diesem Fall aber im selben Strang. Die Überlappung der Emission von CylQ und der Absorption von Thiazolrot sind äußerst vielversprechend (vgl. **Abb, 49**) und wie bereits in Kapitel 4.4.1. gezeigt, ist ein deutlicher Energietransfer möglich. Die beiden Chromophore wurden so angeordnet, dass Thiazolrot und CylQ direkt nebeneinander liegen und dass das Uracil der Uridin-Base, an der CylQ verknüpft ist, nicht zwischen den Farbstoffen liegt. Bemerkenswert bei dieser DNA-Sonde ist das erstmals zwei Techniken zur DNA-Modifikation in einem Strang kombiniert wurden. Thiazolrot wurde zusammen mit dem 2'-O-Propargyl-Uridin während der Festphasensynthese als Phosphoramidit eingebaut. CylQ wurde erst hinterher an das Uridin durch die kupferkatalysierte Cycloaddition verknüpft. Diese Kombination ist nach unserem Wissen neuartig. Durch die Ausbildung eines Doppelstranges mit Ziel-DNA soll die Wechselwirkung der Chromophore gestört werden und sich die spektralen Eigenschaften verändern. Die folgenden Untersuchungen sollen zeigen, ob eine FRET basierte DNA-Sonde mit CylQ und TR möglich ist.



DNA15	3'- C-A-G-T-C-A- Y - X -T-T-G-A-C-G-T-A-C -5'
DNA15g	5'- G-T-C-A-G-T-T-A-A-A-C-T-G-C-A-T-G -3'
DNA16	3'- C-A-G-T-C-A- Y -A- X -A-C-G-T-A-C-G-T -5'
DNA16g	5'- G-T-C-A-G-T-T-T-A-T-G-C-A-T-G-C-A -3'

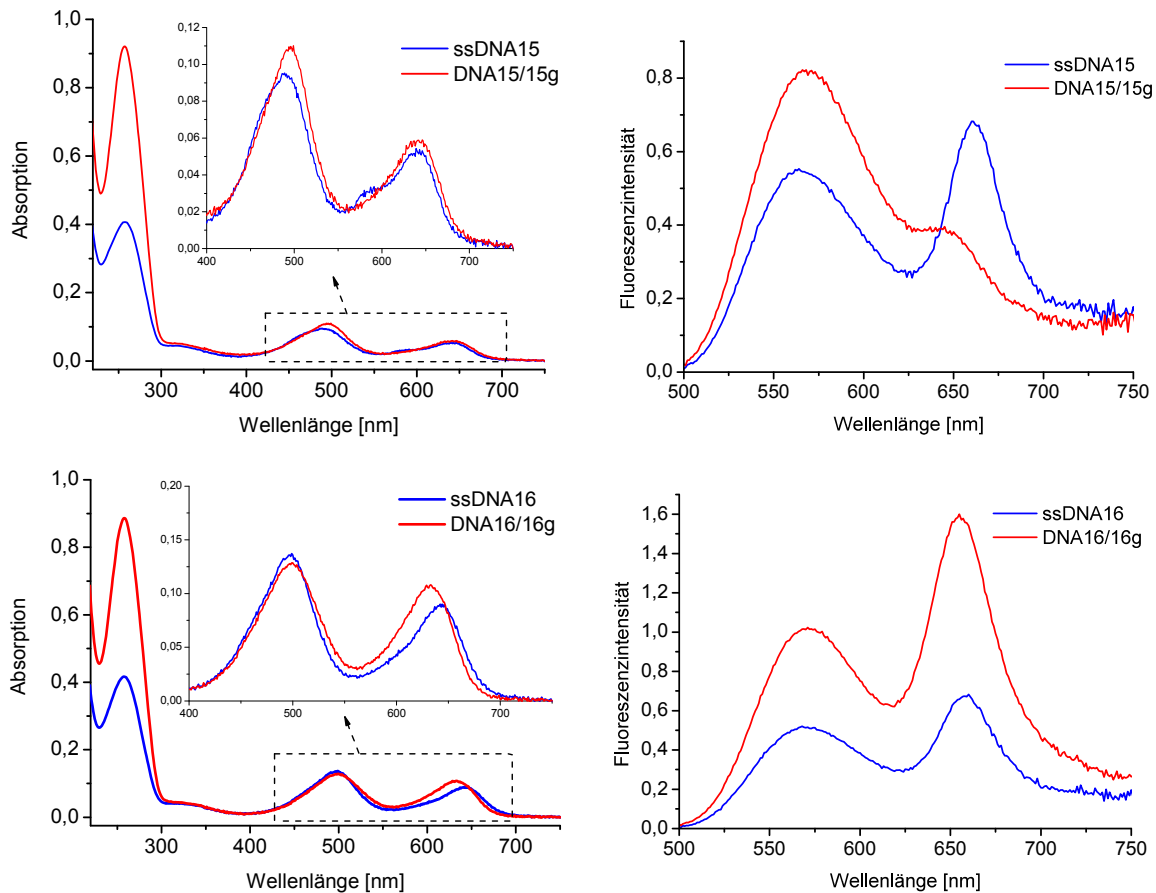


Abb. 54: Absorptions- und Fluoreszenzspektren der Einzel- und Doppelstränge von **DNA15** und **DNA16** ($c = 2,5 \mu\text{M}$ in 10 mM NaPi, pH 7, 20°C, mit NaCl $c = 250 \text{ mM}$, $\lambda_{\text{exc}} = 495 \text{ nm}$).

Die Absorptionsspektren beider Duplexe **DNA15/15g** und **DNA16/16g** sowie der modifizierten Einzelstränge **DNA15** und **DNA16** zeigen die beiden typischen Absorptionsbanden von CylQ und TR. CylQ weist eine typische Monomer - Bandenform auf, mit einem Maximum bei $\lambda_{\text{max/CylQ}} = 495 \text{ nm}$. Im Einzelstrang DNA15 liegt das Maximum leicht verschoben bei $\lambda_{\text{max/CylQ}} = 487 \text{ nm}$). Die Thiazolrot-typische Absorption weist ein Maximum bei $\lambda_{\text{max/TR}} = 640 \text{ nm}$ auf. In **DNA16** sind die Maxima von TR zueinander verschoben. Im Einzelstrang liegt es bei $\lambda_{\text{max/TR}} = 644 \text{ nm}$ und im Doppelstrang bei $\lambda_{\text{max/TR}} = 633 \text{ nm}$. Die Unterschiede kann man darauf zurückführen, dass in **DNA16** eine Base zwischen den Chromophoren liegt und damit zusätzliche Wechselwirkungen auftreten. Die Unterschiede sind jedoch nicht sehr groß und die beiden Maxima sind gut voneinander getrennt.

Tabelle 12: Optische Daten zu **DNA15** und **DNA16** Einzel- und Doppelstrang. Fluoreszenzmaxima von FRET Donor (CylQ) und FRET Akzeptor (TR) sowie die Verhältnisse der Fluoreszenzintensität (FI) im jeweiligen Maximum.

DNA	$\lambda_{\text{max/F}}$ CylQ [nm]	$\lambda_{\text{max/F}}$ TR [nm]	$FI_{\text{TR}}/FI_{\text{CylQ}}$	T_m [°C]
ssDNA15	564	660	1,2	-
DNA15/15g	568	645	0,5	58,7
ssDNA16	568	659	1,3	-
DNA16/16g	571	655	1,6	62,7

Die Fluoreszenzspektren von **DNA15** und **DNA15/15g** unterscheiden sich stark. Bei **DNA15** sind im Einzelstrang zwei Banden zu erkennen. Zum einen die CylQ-Fluoreszenz bei $\lambda = 564$ nm und zum anderen die Fluoreszenz von Thiazolrot bei $\lambda = 660$ nm. Die deutlich intensivere Fluoreszenzbande von TR (Intensitätsverhältnis 1,2) zeigt einen erfolgreichen FRET an. Interessant ist das Fluoreszenzverhalten im Doppelstrang. Wie erhofft, bricht hier die FRET-Effizienz nach Hybridisierung mit einem Gegenstrang stark ein. Das Intensitätsverhältnis liegt mit 0,5 zum größten Teil auf der Seite von CylQ. Die Emission von CylQ ist mit einem Maximum bei $\lambda = 566$ nm noch intensiver als im Einzelstrang und um 15 nm hypsochrom verschoben. Die Emission von TR hingegen ist bis auf eine kleine Schulter bei $\lambda = 645$ nm nur noch schwach vorhanden. Dieser Prozess ist sogar mit bloßem Auge zu verfolgen und zeigt einen deutlichen Farbumschlag von orange (Einzelstrang) nach grün (Doppelstrang).

Im System **DNA16** und **DNA16/16g** zeigt sich ein ganz anderes Bild. Sowohl im Einzel- als auch im Doppelstrang ist ein effizienter FRET möglich mit Fluoreszenzmaxima bei $\lambda = 571$ nm und 655 nm und einem Intensitätsverhältnis der Maxima von 1,6. Die Fluoreszenzintensität des Doppelstranges ist dabei auch doppelt so groß. Dieser Effekt ist unerwartet. Verglichen mit **DNA15** und **DNA15/15g** ist einzig die Intensität von **DNA16/16g** so intensiv. Wie ist das zu erklären? Möglicherweise finden hier zwei Mechanismen statt. In **DNA15**, **DNA15/15g** und im flexiblen Einzelstrang **DNA16** sind die Abstände der beiden Moleküle sehr gering. Es kann zu Aggregation zwischen Donor und Akzeptor kommen. Deshalb kann neben

dem Förster-Energietransfer (1 – 10 nm) auch ein gewisser Anteil an statischer Fluoreszenzlöschung durch Aggregation vorliegen.^[269] Das Absorptionsspektrum zeigt jedoch keine Anzeichen von ausgeprägter Aggregatsbildung, wie z. B. hypsochrome Verschiebung der Absorptionsmaxima. In **DNA16/16g** ist davon auszugehen, dass nach der Ausbildung einer Doppelhelix der Abstand zwischen Donor und Akzeptor am größten ist und somit der Förster-Energietransfer dominiert.

Festzuhalten bleibt: In beiden Fällen ist durch Energietransfer eine Sekundäremission festzustellen. In einer Anordnung, in der beide Farbstoffe direkt nacheinander folgen, ist ein effektiver FRET nur im Einzelstrang möglich und bei Zugabe eines Gegenstranges tritt eine deutliche Fluoreszenzänderung ein. Aufgrund der FRET-Änderung stellt aber nur **DNA15** eine potentielle DNA-Sonde dar.

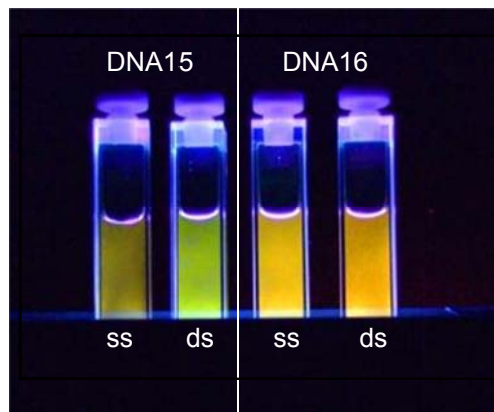


Abb. 55: Die Fluoreszenzsonden **DNA15** und **DNA16** unter einer herkömmlichen UV-Lampe. Bei **DNA15** findet in Anwesenheit von Ziel-DNA ein erfolgreicher FRET statt und die Farbe schlägt von Orange nach grün um. Bei **DNA16** ist kein Unterschied bzw. Farbumschlag festzustellen, beide Proben sind orange ($c = 2,5 \mu\text{M}$ in 10 mM NaPi, pH 7, 20°C, mit NaCl $c = 250 \text{ mM}$).

4.5.2 Homodimere („ECHO-Sonden“)

Ikeda und *Okamoto* beschrieben 2008 erstmals funktionelle DNA Sonden die auf Cyanin-Dimeren in einer Interstrang Anordnung basieren.^[105, 106] Dabei handelte es sich um Dimere aus Thiazolorange.^[104, 271] Derartige Dimer-Sonden lösen einige Probleme bisheriger Sonden und überzeugen durch ihre Einfachheit. Ein Hauptvorteil liegt im geringen synthetischen Aufwand, da nur ein Farbstoff und eine Verknüpfungstechnik notwendig sind. Im Vergleich zu *Molecular Beacons* ist keine Kombination aus Stamm- und Schleifen-Region als höhere Struktureinheit nötig. Intrastrang-Sonden sind in ihrem Aufbau deutlich minimalistischer, was ein weiterer positiver Aspekt ist und sie zu einer vielversprechenden Alternative macht. Die Grundidee ist es, eine Sonde zu entwickeln, die wie ein intelligenter Lichtschalter funktioniert. Erst nach Erkennen einer Ziel-Sequenz wird das Licht angeschaltet und ein Signal entsteht. Im Einzelstrang wird die Fluoreszenz der Farbstoff-Dimere durch excitonische Wechselwirkungen gelöscht. Durch Ausbildung einer doppelhelikalen Struktur werden die Chromophore getrennt, die Wechselwirkungen unterbrochen und ein Fluoreszenzsignal entsteht. Dieses Konzept wurde bereits von *Okamoto et al.* sehr erfolgreich und beeindruckend mit Thiazolorange und anderen Benzothiazol-, Oxazol- und Chinolin-Derivaten erarbeitet.^[104, 271] Durch Okamoto bekamen diese Sonden auch den Namen „**ECHO-Sonden**“.^[103, 104] ECHO steht für „*Exciton-Controlled Hybridization-Sensitive Fluorescent Oligonucleotides*“. *Okamoto* war damit beispielsweise in der Lage, mRNA in lebenden Zellen zu detektieren und visualisieren.^[104, 272, 273]

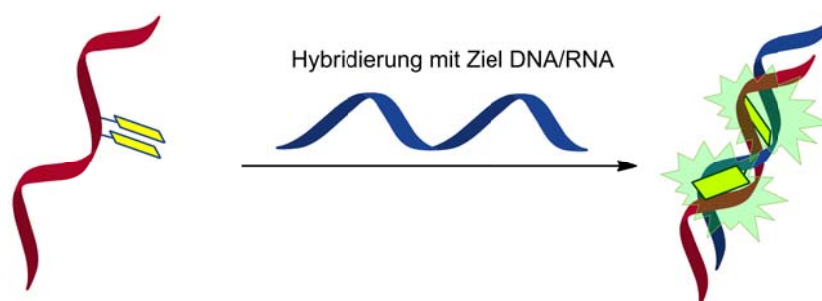


Abb. 56: Schematische Darstellung der Funktionsweise einer excitonkontrollierten Fluoreszenzsonde. Nicht emittierende H-Aggregate im Einzelstrang werden durch die Hybridisierung mit einem Gegenstrang aufgehoben und zeigen monomertypische Fluoreszenz (Abbildung nach Vorbild von *Okamoto et al.*^[104]).

Cyaninfarbstoffe, die auf Benzothiazolen oder Benzoxazolen basieren, haben den großen Nachteil ihrer schlechten Photostabilität. CylQ ist daher eine interessante Alternative, da es ebenfalls bei ca. 500 nm absorbiert und als unsymmetrischer Cyaninfarbstoff sich gut für Wechselwirkungen eignet. Schon bei den Versuchen mit CylQ-Dimeren in Interstrang Anordnungen zeigten sich Wechselwirkungen (vgl. 4.4.1), die in der Absorption und Fluoreszenz sichtbar wurden. Bei einer Intrastrang-Anordnung zweier CylQ-Moleküle sollte eine sehr effektive Wechselwirkung möglich sein, da die Chromophore parallel übereinander liegen und so die gleiche Orientierung besitzen.

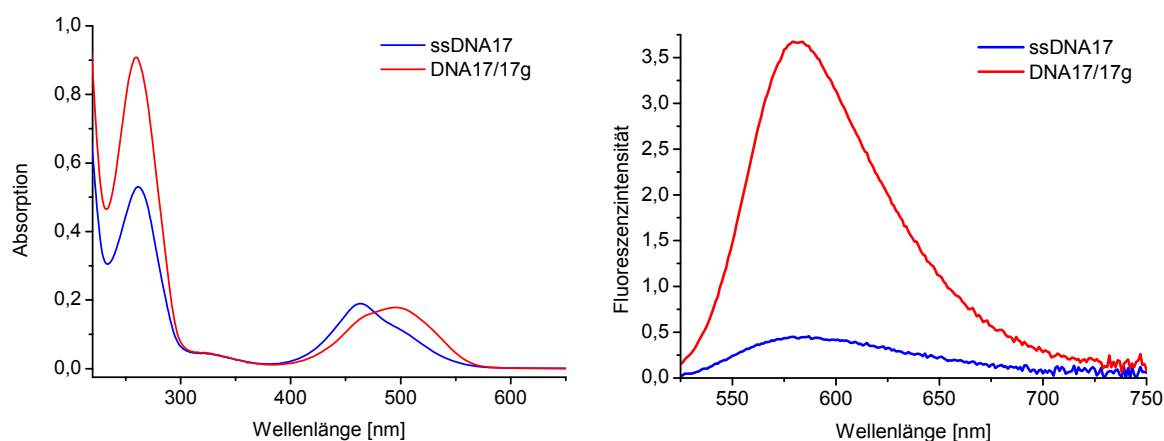
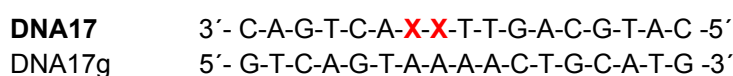
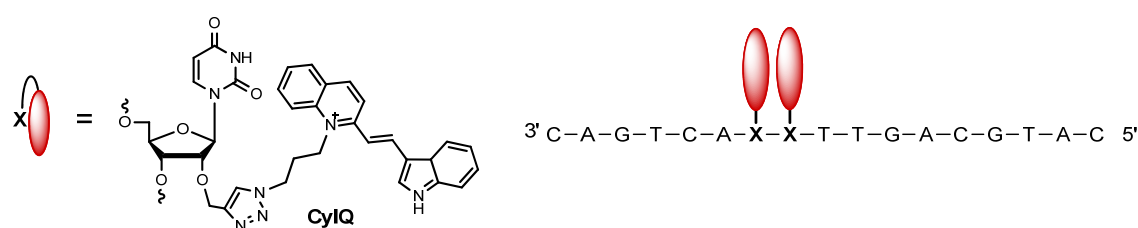


Abb. 57: Absorptions- und Emissionsspektrum von **DNA17** und **DNA17/17g** ($c = 2,5 \mu\text{M}$ in 10 mM NaP_i , pH 7, 20°C, mit NaCl $c = 250 \text{ mM}$, $\lambda_{\text{exc}} = 520 \text{ nm}$).

Tabelle 13: Fluoreszenzmaxima, Stokes-Verschiebung, Fluoreszenzquantenausbeuten, Extinktionskoeffizienten bei 495 nm, Helligkeit und Schmelztemperaturen von **DNA17** Einzel- und Doppelstrang.

DNA	$\lambda_{\text{max/F}}$ [nm]	Φ_F	ϵ_{495} [L/mol·cm]	B	T_m [°C]
ssDNA17	585	0,02	71000	1400	-
DNA17/17g	582	0,09	49000	4400	60,0

Das Spektrum von **DNA17** zeigt auf den ersten Blick einen deutlichen Unterschied zwischen Einzel- und Doppelstrang im Absorptionsbereich von CylQ. Der Doppelstrang **DNA17/17g** zeigt eine Bande, die mit einem Maximum bei $\lambda = 495$ nm exakt dem Maximum eines Monomers entspricht. Die Bande ist jedoch etwas breiter und zeigt eine leichte Schulter bei $\lambda = 463$ nm. Der Einzelstrang (**DNA17**) hingegen zeigt ein ganz anderes Spektrum. Er hat ein zu höherer Energie verschobenes Maximum bei $\lambda = 463$ nm, was der Schulter beim Doppelstrang entspricht. Der Einzelstrang zeigt auch eine leichte Schulter bei $\lambda = 495$ nm, was exakt dem Absorptionsmaximum im Doppelstrang oder einem CylQ-Monomer entspricht. Diese Umkehr der Banden-Symmetrie und die hypsochrome Verschiebung zeigen, dass eine intensive Wechselwirkung zwischen den beiden CylQ-Molekülen stattfindet, die sich auch auf die Fluoreszenz auswirkt. Bereits bei den Interstrangdimeren war diese Symmetrienumkehr und die hypsochrome Verschiebung zu beobachten, dort war



Abb. 58: Bei Hybridisierung mit der Ziel-DNA wechselt die Farbe der Sonde von gelb nach rot.

jedoch eine Umkehr in eine monomerähnliche Absorption nur ansatzweise zu erkennen. Die Änderung in der Absorption ist sogar bei Tageslicht in einem Farbumschlag von gelb nach rot in den Küvetten zu beobachten (s. Abb. 58). Die Fluoreszenzspektren von Einzel- und Doppelstrang geben ein interessantes Ergebnis. Während die Fluoreszenz im Einzelstrang (**DNA17**) nahezu vollständig gelöscht ist, zeigt der Doppelstrang (**DNA17/17g**) eine intensive Fluoreszenz. Die Maxima beider Zustände liegen bei $\lambda = 580$ nm und damit um ca. 15 nm zu höheren Wellenlängen verschoben als die Emission eines CylQ-Monomers. Der Fluoreszenzanstieg vom Einzel- zum Doppelstrang steigt um das Achtfache an. Der starke

Fluoreszenzanstieg ist auch zu beobachten, wenn nicht im CyIQ-typischen Maximum bei $\lambda = 495$ nm angeregt wird, sondern an allen Stellen zwischen 463 und 520 nm. Der Vorgang kann sogar mit dem Auge verfolgt werden. Eine Lösung der Sonde ohne Ziel-DNA ist gelblich und wird nach Hybridisierung mit dem Gegenstrang rötlich. Unter einer UV-Lampe zeigt sich nur eine intensive Fluoreszenz, wenn die Sonde mit Gegenstrang vorliegt.

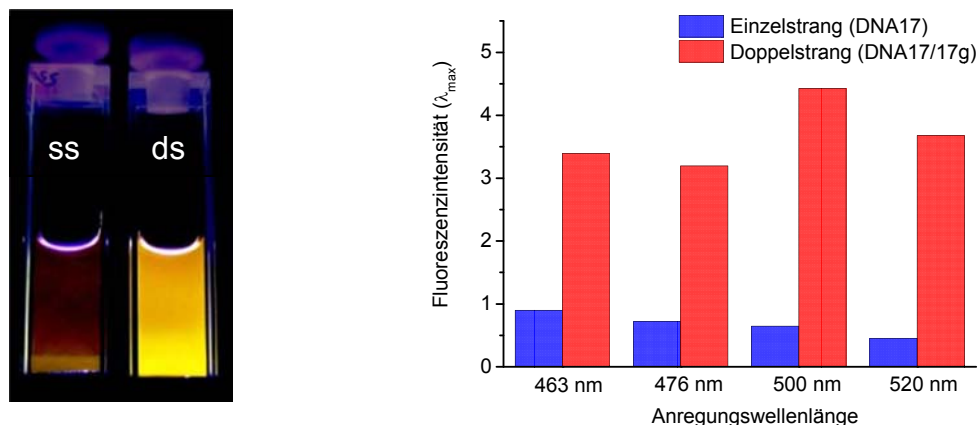


Abb. 59: Links: Detektion von Ziel-DNA mit der Fluoreszenzsonde **DNA17** unter einer herkömmlichen UV-Lampe. Ohne Gegenstrang zeigt **DNA17** nahezu keine Fluoreszenz (ss). Nach Zugabe komplementärer DNA steigt die Fluoreszenz um das Achtfache (ds). Rechts: Fluoreszenzanstieg der Sonde bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen. ($c = 2,5 \mu\text{M}$ in 10 mM NaPi, pH 7, 20°C, mit NaCl $c = 250$ mM, $\lambda_{\text{exc}} = \text{s. Abb.}$).

Genau dieses Ergebnis stellte das Ziel bei der Entwicklung von DNA-Fluoreszenzsonden dar. Eine Art Lichtschalter, der anzeigt, wenn eine Zielstruktur erkannt wurde. Unter all den untersuchten Kombinationen erzielt die CyIQ-Dimer-Sonde **DNA17** in einer Intrastranganordnung die besten Ergebnisse. Auf dieser Basis wird nun in weiteren Schritten versucht, die Grenzen und Anwendungsgebiete der Sonde zu untersuchen. Zunächst muss geklärt werden, ob die Sonde auch in anderen Sequenzen funktioniert. In Kapitel 5.1 wird die Sonde erstmals für die Detektion von Punktmutationen eingesetzt.

Es bleibt die Frage zu klären, welcher photophysikalische Prozess zu den beobachteten Ergebnissen führt. Nach der Exciton-Theorie von *Kasha* ist eine hypsochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums auf H-Aggregate zurückzuführen.^[86] Diese Theorie wurde vielfach an Cyaninfarbstoffen beobachtet und ist auch in diesem Fall durch die parallele Anordnung der CyIQ-Moleküle anzunehmen.

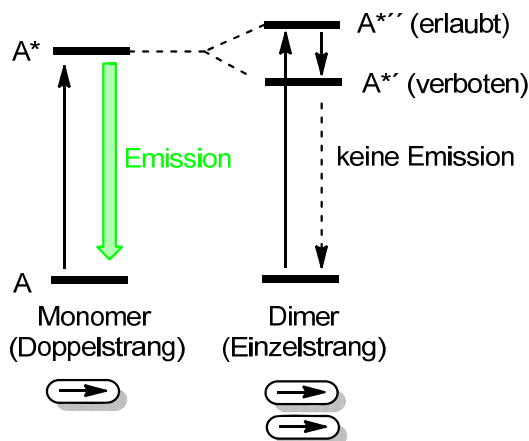


Abb. 60: Energieniveauschema von Monomeren und H-Aggregaten unter excitonischer Aufspaltung des angeregten Zustandes.

Typische H-Aggregate zeigen keine Fluoreszenz.^[89, 204] Der Grund hierfür liegt in der schnellen Desaktivierung des höheren Zustandes der Davydov-Aufspaltung (s. Kapitel 3.3). Die Desaktivierung erfolgt in den niedrigeren Zustand, aus dem dann eine Emission theoretisch verboten ist und daher nicht

fluoresziert (s. Abb. 60). Genau dies ist auch im Einzelstrang von **DNA17** zu beobachten. Nach Bildung einer Doppel-

helix mit der Ziel-DNA wird der parallel gestapelte CylQ-Dimer auseinandergetrieben und die beiden CylQ-Moleküle interkalieren in die DNA bzw. legen sich in eine der Furchen (s. Abb. 56). Durch den räumlich getrennten Zustand finden keine excitonischen Wechselwirkungen mehr statt und die typische monomerartige Emission ist zu sehen. Dies ist deutlich an der Umkehr des Absorptionsspektrums hin zu einem monomerartigen Verlauf zu erkennen. Diese Beobachtungen decken sich mit den Arbeiten von *Okamoto*. Er beobachtet bei einer Interstrang-Dimer-Anordnung von Thiazolorange ebenfalls eine hypsochrome Verschiebung und Symmetrienumkehr im Absorptionsspektrum bei gleichzeitigem Fluoreszenzanstieg im Doppelstrang.^[105] Auch bei Thiazol-Derivaten wurde das beobachtet.^[104] Weshalb die Fluoreszenz im Einzelstrang nicht komplett gelöscht ist, hat ebenfalls mit den H-Aggregaten zu tun. Die Löschung ist dann am effektivsten, wenn die Übergansdipolmomente der Farbstoffe genau parallel zueinander liegen.^[89, 274] Werden sie jedoch etwas zueinander verdreht, so sind erlaubte Zustände für die Emission möglich (vgl. Kapitel 3.3).^[104] Durch die enge Anbindung von CylQ an die DNA und das dazwischen liegende Uracil ist eine leichte Verdrehung der Farbstoffe anzunehmen, was eine gewisse Restfluoreszenz erklärt. Eine alternative Erklärung ist auch durch strukturelle Subensembles in Form nicht gestapelter CylQ-Molekülen möglich. Eine Koexistenz monomerer und dimerer Formen des Farbstoffs ist in einem komplexen System wie der DNA denkbar.

Um die Ergebnisse durch weitere Untersuchungen zu bekräftigen, wurden Anregungsspektren, CD-Spektren und Temperaturabhängige Absorptions- und Fluoreszenzspektren gemessen.

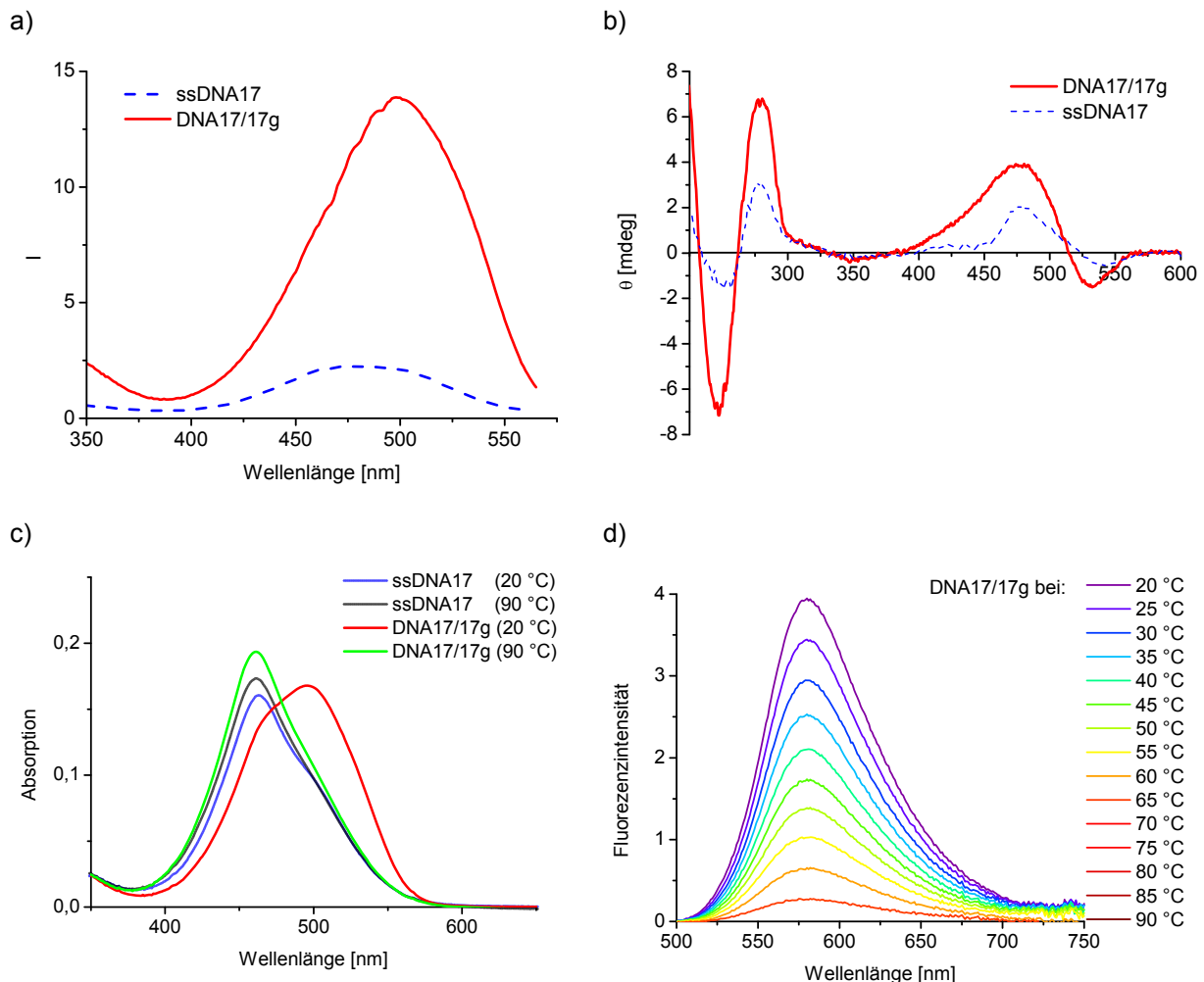


Abb. 61: a) Anregungsspektrum von DNA17 und DNA17/17g für das Fluoreszenzmaximum bei $\lambda = 580$ nm. b) CD-Spektrum von DNA17 und DNA17/17g. c) Temperaturabhängiges Absorptionsspektrum von DNA17 und DNA17/17g bei 20 °C und 90 °C. d) Temperaturabhängiges Fluoreszenzspektrum von DNA17/17g ($\lambda_{\text{exc}} = 495$ nm). (Alle Proben: $c = 2,5 \mu\text{M}$ in 10 mM NaPi, pH 7, mit NaCl $c = 250$ mM).

In den Anregungsspektren (**Abb. 61 a**) für das Fluoreszenzmaximum bei $\lambda = 580$ nm zeigt sich keine Bande im Bereich der Aggregate. Im Doppelstrang ist jedoch deutlich der monomertypische Bandenverlauf mit einem Maximum bei ca. $\lambda = 500$ nm zu sehen. Das gleiche Bild zeigt sich im Einzelstrang bei äußerst geringer Intensität. Die Ergebnisse decken sich wiederum mit den Arbeiten von Okamoto.^[104, 105] Das CD-Spektrum des Doppelstranges (**Abb. 61 b**) zeigt einen intensiven positiven und

negativen Cotton-Effekt. Ein solcher Effekt ist dann vorhanden und besonders groß, wenn die Übergangsdipolmomente zweier Moleküle zueinander verdreht sind, wenn also die räumliche Anordnung der Übergangsdipolmomente zueinander nicht 0° , 90° , 180° oder 360° einnimmt.^[275] Folglich sollte eine parallele Anordnung der Farbstoffe wie im Einzelstrang, wo der Verdrehungswinkel der Übergangsdipolmomente gegen 0° geht, ein deutlich schwächeres CD-Signal liefern. Dies ist auch im Spektrum zu erkennen und deckt sich wiederum mit anderen Arbeiten.^[105, 276] Im temperaturabhängigen Absorptionsspektrum (**Abb. 61 c**) ist im Einzelstrang sowohl bei 20°C als auch bei 90°C die kurzwellig verschobene Absorptionsbande der H-Aggregate zu sehen. Im Doppelstrang ist bei Raumtemperatur jedoch deutlich die Monomer-Absorption mit dem typischen Maximum bei $\lambda = 495\text{ nm}$ zu erkennen. Bei 90°C , also im dehybridisierten Zustand der DNA, ist wieder die typische Absorption der Aggregate zu sehen. Im temperaturabhängigen Fluoreszenzspektrum (**Abb. 61 d**) sinkt die Fluoreszenz mit zunehmender Temperatur, wie erwartet. Wichtig ist jedoch, dass dabei keine Verschiebung des Fluoreszenzmaximums zu beobachten ist, was typisch für Excimere oder fluoreszente H-Aggregate wäre. **DNA17** ist somit eine Sonde, die nach *Okamoto* als ECHO-Sonde bezeichnet wird.

Sequenzabhängigkeit:

Okamoto et al. untersuchten bereits sehr früh die Sequenzabhängigkeit von Intrastrang-Sonden mit TO-Dimeren.^[106] Dabei zeigte sich eine Anomalie in den Fluoreszenzspektren bei einer direkten Nachbarschaft zu G/C-Basenpaaren. In diesen Sonden war die Fluoreszenzlöschung im Einzelstrang nicht sehr effektiv. Dieses Verhalten sollte auch für die CylQ-Sonde überprüft werden, zumal bereits durch die Redox Eigenschaften von CylQ bekannt ist, dass Guanin unter Fluoreszenzlöschung oxidiert wird. Daher wurde **DNA18** als G/C-Variante von **DNA17** synthetisiert und spektroskopisch untersucht.

DNA18	3'- C-A-G-T-C-G- X-X -C-T-G-A-C-G-T-A-C -5'
DNA18g	5'- G-T-C-A-G-C-A-A-G-A-C-T-G-C-A-T-G -3'

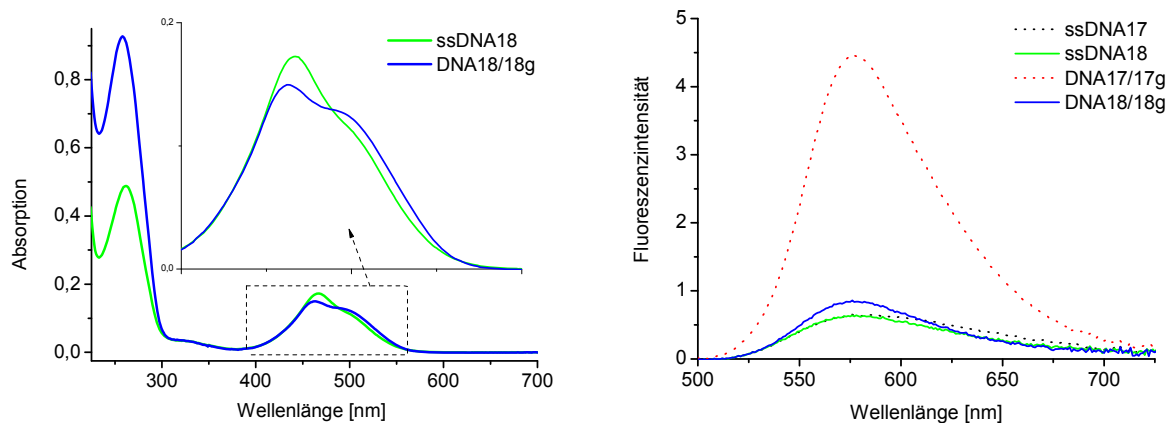


Abb. 62: Absorptions- und Emissionsspektrum von **DNA18** und **DNA18/18g** ($c = 2,5 \mu\text{M}$ in 10 mM NaPi , $\text{pH } 7$, 20°C , mit NaCl $c = 250 \text{ mM}$, $\lambda_{\text{exc}} = 520 \text{ nm}$).

Im Fluoreszenzspektrum von **DNA18** ist leider kaum ein Unterschied mehr zwischen Einzel- und Doppelstrang zu erkennen. Im Vergleich zu **DNA17** wird deutlich, dass die Fluoreszenz deutlich gelöscht ist. Bereits im Absorptionsspektrum ist zu erkennen, dass im Doppelstrang nur eine leichte Veränderung der Bande stattfindet, wobei nach der Hybridisierung mit einem Gegenstrang eine deutliche Verschiebung hin zu Monomeren eintreten sollte. Der Doppelstrang **DNA18/18g** zeigt jedoch immer noch ein Spektrum, das eher typisch für ein H-Aggregat ist. Offensichtlich wird die CyIQ-Aggregation nicht effektiv durch die Duplexbildung aufgehoben. Das könnte an Freiräumen liegen, die im Doppelstrang der neu gewählten Sequenz auftreten. Ein zusätzlicher Grund für die starke Fluoreszenzlöschung im Doppelstrang kann auch eine Guanin-Oxidation sein, wie bereits in Kapitel 0 gezeigt wurde. Diese Erkenntnisse zeigen, dass es eine deutliche Sequenzabhängigkeit gibt, was beim Design von ECHO-Sonden mit CyIQ berücksichtigt werden muss.

Tabelle 14: Fluoreszenzmaxima, Stokes-Verschiebung, Fluoreszenzquantenausbeuten, Extinktionskoeffizienten bei 495 nm und Helligkeit von **DNA18** Einzel- und Doppelstrang.

DNA	$\lambda_{\text{max/F}}$ [nm]	Φ_F	ϵ_{495} [L/mol·cm]	B
ssDNA18	576	0,02	48000	1000
DNA18/18g	576	0,02	51000	1000

5 Bioanalytische Anwendungen von CylQ-DNA

Ziel von Fluoreszenzsonden ist deren Einsatz in der Bioanalytik. Dieses Kapitel zeigt, dass CylQ aufgrund seiner speziellen photophysikalischen Eigenschaften in zwei unterschiedlichen Anwendungsgebieten eingesetzt werden kann.

5.1 Detektion von Punktmutationen

Blond oder brünett, Raucher oder Nichtraucher, Krebs oder Alzheimer? Die Antwort auf diese Fragen liegt manchmal nur an der Variation eines einzelnen DNA-Basenpaares im Genom. Dass die Variation einzelner Basenpaare im humanen Genom bei einer Gesamtzahl von 3,2 Milliarden Basenpaaren eine so entscheidende Rolle spielt, ist von enormer Bedeutung. Einerseits, weil Einzel Nukleotid Polymorphismen (SNPs) der Grund für unsere Individualität sind.^[5] Sie machen jeden Menschen in seinem Phänotyp einzigartig. Gäbe es keine SNPs und lassen wir die Epigenetik außen vor, so würden wir uns alle recht ähnlich sehen. Andererseits werden SNPs jedoch sehr gefährlich, wenn sie uns anfälliger für Krankheiten machen oder dafür sorgen, dass ein Medikament schlechter wirkt als bei anderen.^[8, 11, 12] Im Extremfall kann aus einer einzigen Punktmutation eine schwerwiegende Krankheit entstehen. Bestimmte Krebsarten können auf diese Weise entstehen.^[9] Polymorphismen spielen auch bei der Entstehung von Morbus Alzheimer eine Rolle.^[10]

Tatsächlich unterscheiden sich unsere Genome in ungefähr 3 Millionen Basenpaaren. Das sind 0,1 % des Genoms.^[5, 6] *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) sind variierte Basenpaare, die bei mindestens 1% der Bevölkerung auftreten. Bei weniger als 1 % spricht man von Punktmutationen. Die Ursache ist aber immer die gleiche, ein ausgetauschtes Basenpaar (s. **Abb. 63**). Punktuelle Veränderungen in der DNA werden auch durch Schäden an den DNA-Basen verursacht. Täglich wird unsere DNA durch UV-Strahlung, Chemikalien oder Reaktive Sauerstoffspezies tausendfach geschädigt. Die wohl bekanntesten Beispiele sind die Bildung von Thymin-Dimeren und 8-Oxoguanin (s. **Abb. 32**).

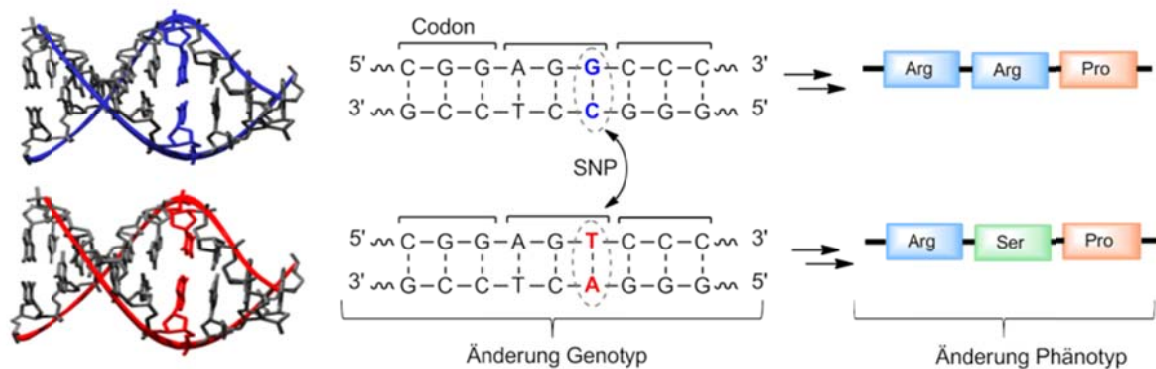


Abb. 63: Beispiel für die Entstehung und Auswirkung von SNPs. Durch die Variation eines Basenpaares in der Wildtyp-DNA (oben) entsteht die Mutante (unten) die eine andere Aminosäure exprimiert.

Liegt eine Punktmutation (oder SNP) oder eine geschädigte Nukleobase in einer proteincodierenden Region der DNA und wird sie vom körpereigenen Reparaturmechanismus nicht beseitigt, kann dies zu falschen Translations-, Transkriptions- und Expressionsprodukten führen. Das zieht eine ganze Palette an Auswirkungen (positiv und negativ) nach sich. Eine der Folgen ist, das bestimmte Peptide fehlerhaft aufgebaut und somit in ihrer biologischen Funktion gestört sind. Davon können Enzyme betroffen sein, die Regulations- oder Reparatur-Aufgaben erfüllen. Ein besonders eindringliches Beispiel ist das Tumorsuppressorprotein p53,^[18, 20] das eine zentrale Rolle in der körpereigenen Tumorbekämpfung spielt. In der Hälfte aller Tumoren ist gerade dieses wichtige Enzym inaktiv.^[20] Der Grund ist eine Mutation im p53-Gen. In anderen Fällen wird deutlich das SNPs für bestimmte Veranlagungen verantwortlich sind, so gibt es ungefähr 8 SNPs die bei der Prädisposition für Nikotinsucht eine entscheidende Rolle spielen.^[277] Aufsehererregende Studien zeigen, dass SNPs sogar Einfluss auf unsere Persönlichkeit haben können und sich in der Ausprägung impulsiven Verhaltens äußern.^[278, 279]

Die Motivation zur Detektion von Punktmutationen liegt auf der Hand. Die Möglichkeit, eine Krankheit vor ihrem Ausbruch zu erkennen, ist Voraussetzung für eine ursächliche Therapie. Zum anderen kann in der Pharmazie gezielt an Wirkstoffen gearbeitet werden, die individuelle Veranlagungen berücksichtigen. SNPs sind daher neben epigenetischen Merkmalen der wichtigste und interessanteste Ansatzpunkt zukunftsweisender DNA-Analytik

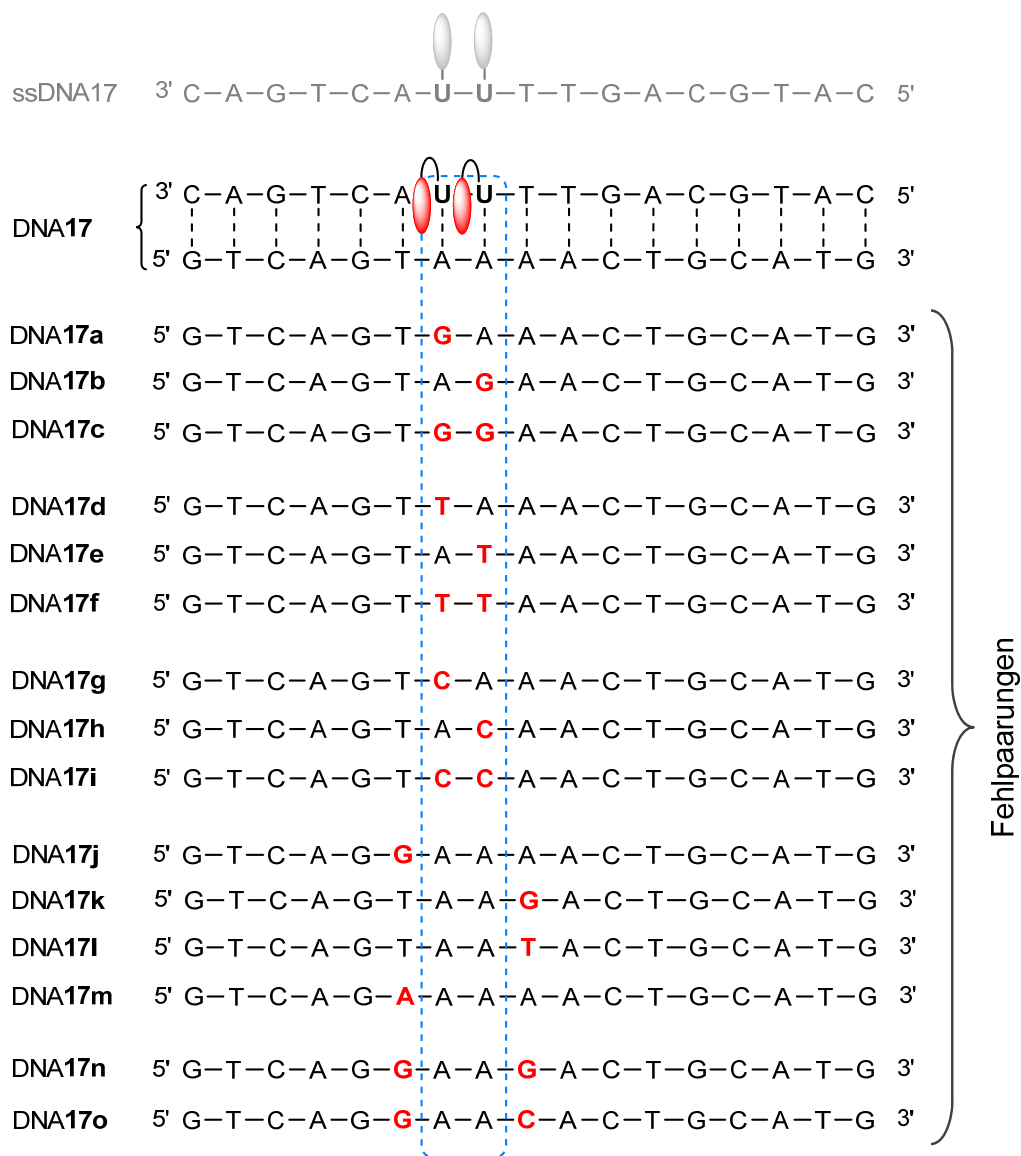


Abb. 64: Übersicht der DNA-Sequenzen zur Detektion von Punktmutationen mit der Sonde **ssDNA17**. DNA17 stellt den korrekt gepaarten (*match*) Fall dar.

Für die Detektion von Punktmutationen mit der SNP-Sonde **DNA17** wurde eine ganze Reihe unterschiedlicher Sequenzen untersucht (S. **Abb. 64**). Zunächst werden die direkt benachbarten Basen untersucht. Es wird jeweils zuerst die Einzelbasenmutation an beiden möglichen Stellen untersucht. Zusätzlich wird noch die Doppelfehlpaarung an beiden Stellen untersucht, um zu sehen, wie diese das Ergebnis beeinflussen. Hier zeigt sich ein großer Vorteil der Farbstoffverknüpfung an ein Nukleotid im Vergleich zur Verknüpfung über nicht-nukleotidische acyclische Linker, denn über das 2'-O-Propargyl-Uridin bleibt die Basenpaarung intakt. Dies

stört einerseits die DNA-Duplexbildung weniger und zum anderen können Veränderungen in der Basenpaarung, die einen direkten Einfluss auf den Fluorophor haben, ein verändertes optisches Signal liefern. Aus allen bisherigen Untersuchungen geht hervor, dass die excitonischen Wechselwirkungen von CyIQ-Dimeren sensibel auf ihre Umgebung reagieren, was sich gerade bei Basenfehlpaarungen zeigen sollte. Um ein möglichst gutes Bild der Auswirkungen auf CyIQ zu erhalten, wurden in weiteren Sequenzen auch noch die Basen in benachbarten, aber versetzten Positionen untersucht. In der Sonde **DNA17** ist die korrekte Basenpaarung (match) ein A/U-Paar, was nach der Watson-Crick-Anordnung identisch mit einer A/T-Paarung ist. Die im Schema links liegenden Positionen werden als „erste Stelle/Position“ bezeichnet und die rechts liegenden als „zweite Stelle/Position“.

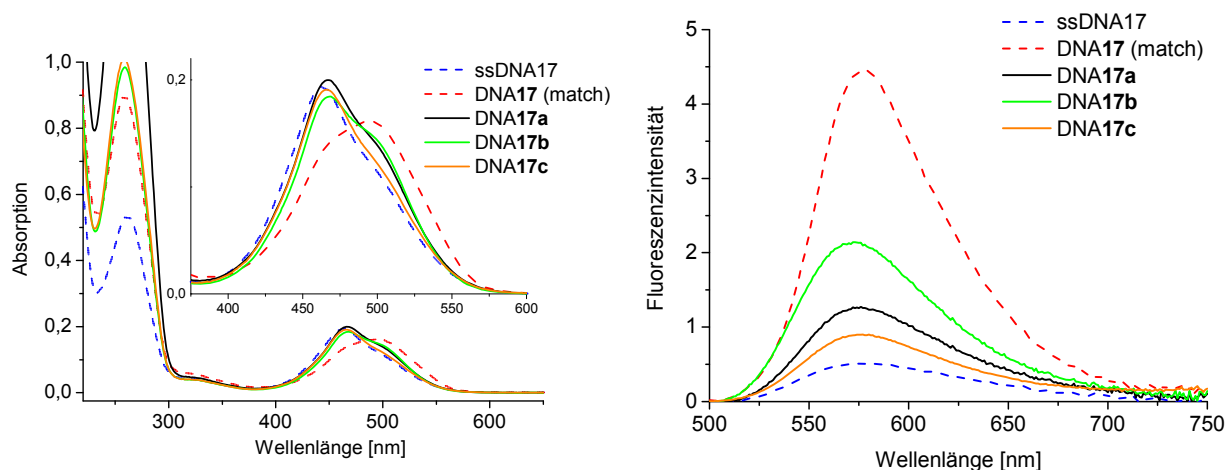


Abb. 65: Absorptions- und Emissionsspektrum von DNA17 und DNA17a-c ($c = 2,5 \mu\text{M}$ in 10 mM NaPi, pH 7, 20°C, mit NaCl $c = 250 \text{ mM}$, $\lambda_{\text{exc}} = 495 \text{ nm}$).

Die Absorptionsspektren der Serie **DNA17a-c**, die Guanin-Fehlpaarungen aufweisen, zeigen bereits einen deutlichen Unterschied. Der korrekt gepaarte Strang **DNA17** zeigt als einziger eine typische Monomer Absorptionsbande mit einem Maximum bei $\lambda = 495 \text{ nm}$. Alle fehlgepaarten Stränge sind wie die Sonde selbst hypsochrom verschoben und zeigen ein Maximum bei $\lambda = 465 \text{ nm}$.

Das Fluoreszenzspektrum macht die Unterschiede besonders deutlich. Der korrekte Doppelstrang zeigt mit Abstand die intensivste Fluoreszenz mit einem Maximum bei $\lambda = 576 \text{ nm}$. Der Einzelstrang ist im Vergleich zu allen Strängen am

deutlichsten gelöscht. Dieses Ergebnis ist an sich schon äußerst bemerkenswert, da man einen eindeutigen Unterschied zwischen korrekt gepaarter DNA und Mutation sieht. Zusätzlich sieht man sogar noch ein Unterschied in den Positionen der G-Fehlpaarung. Die Mutation **DNA17a**, welche direkt zwischen den beiden Fluorophoren liegt, ist stärker gelöscht als die von **DNA17b**. Die doppelte Fehlpaarung in **DNA17c** zeigt eine noch höhere Fluoreszenzlöschung.

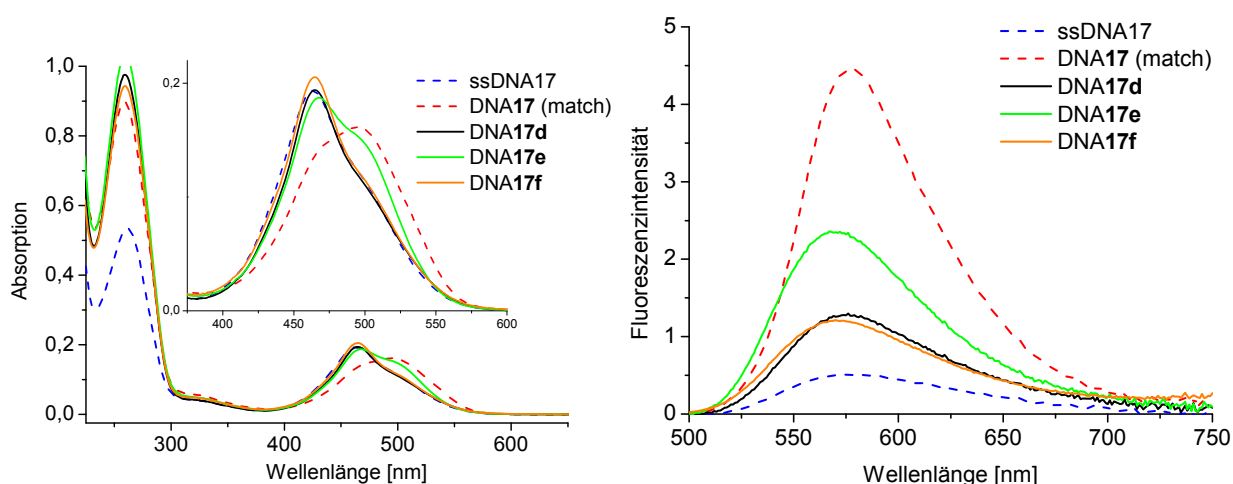


Abb. 66: Absorptions- und Emissionsspektrum von DNA17 und DNA17d-f ($c = 2,5 \mu\text{M}$ in 10 mM NaP_i , pH 7, 20°C, mit NaCl $c = 250 \text{ mM}$, $\lambda_{\text{exc}} = 495 \text{ nm}$).

Diese DNA-Reihe (**DNA17d-f**), die Thymin-Fehlpaarungen aufweist, zeigt im Absorptionsspektrum ein ganz ähnliches Bild wie bei den Guanin-Fehlpaarungen. Wieder zeigt der korrekt gepaarte Doppelstrang eine typische Absorptionsbande eines CylQ-Monomers. Die Doppelstränge mit den U/T-Fehlpaarungen haben auch hier ein hypsochrom verschobenes Maximum. Das Fluoreszenzspektrum zeigt auch in diesem Fall einen deutlichen Unterschied zwischen korrekter und falscher Basenpaarung.

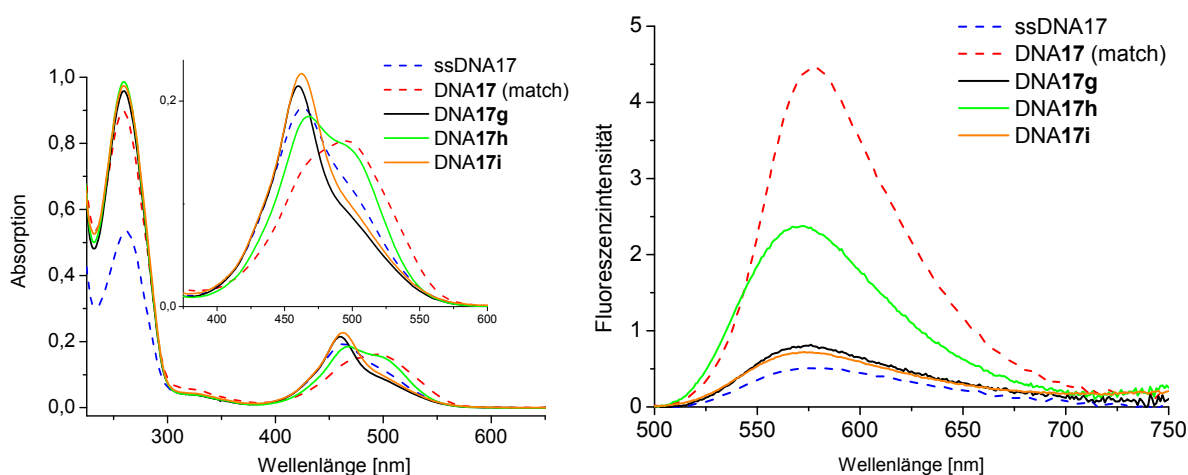


Abb. 67: Absorptions- und Emissionsspektrum von DNA17 und DNA17g-i ($c = 2,5 \mu\text{M}$ in 10 mM NaPi, pH 7, 20°C, mit NaCl $c = 250 \text{ mM}$, $\lambda_{\text{exc}} = 495 \text{ nm}$).

Die letzte der drei möglichen Basenfehlpaarungen, die Cytosin-Fehlpaarung (**DNA17g-h**), zeigt exakt dasselbe Verhalten wie die bereits Untersuchten. Sowohl im Absorptions- als auch im Emissionsspektrum setzt sich das gleiche Bild durch wie bei den U/G- und U/T-Fehlpaarungen.

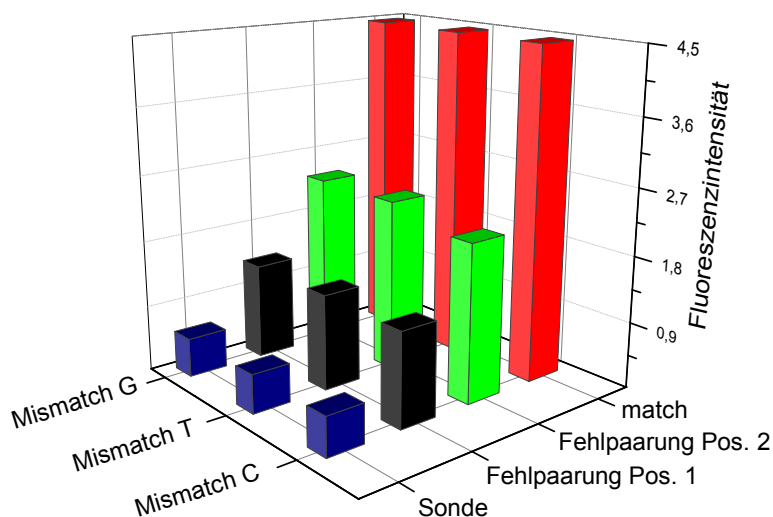


Abb. 68: Auswertung der Fluoreszenzsignale von Einzelbasenmutationen gegenüber Uridin im Vergleich zur Sonde ohne Gegenstrang (ssDNA17) und korrektem Doppelstrang (*match*).

Zusammenfassend lässt sich bis hierher feststellen, dass sich bei den direkt gegenüberliegenden Fehlpaarungen alle drei, U/G, U/T und U/C gleich verhalten. Die

erste Position ist immer stärker gelöscht als die zweite. Im Falle einer Einzelbasenmutation kann also im Prinzip detektiert werden, an welcher Stelle die Fehlpaarung vorliegt, aber nicht welche Base die Falsche ist (vgl. **Abb. 68**).

Um herauszufinden, wie weit sich der Einfluss von Fehlpaarungen in der weiteren Umgebung auf das Fluoreszenzverhalten der Sonde auswirkt, wurden die Stränge **DNA17j-m** untersucht, die Fehlpaarungen an versetzten Positionen aufweisen.

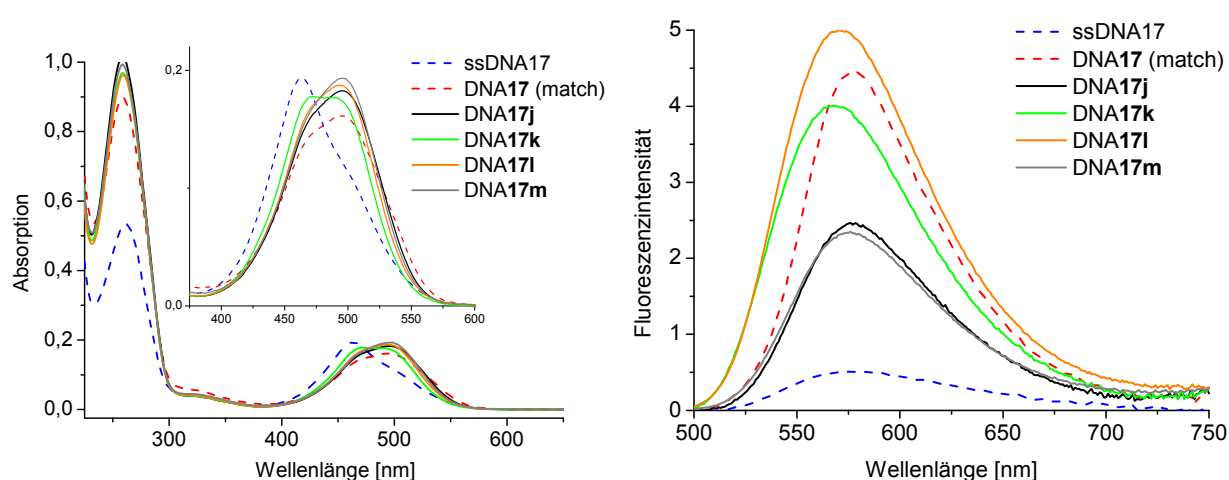


Abb. 69: Absorptions- und Emissionsspektrum von DNA17 und DNA17j-m ($c = 2,5 \mu\text{M}$ in 10 mM NaP_i , pH 7, 20°C , mit NaCl $c = 250 \text{ mM}$, $\lambda_{\text{exc}} = 495 \text{ nm}$).

Hier zeigt sich ein deutlich verändertes Bild. Schon das Absorptionsspektrum verhält sich anders: Man sieht bei den Fehlpaarungen eine Absorptionsbande, die eher der eines Monomers bzw. des korrekten Doppelstranges gleicht. Die Banden sind dabei sehr breit, haben aber ein Maximum bei $\lambda = 495 \text{ nm}$. Zudem haben sie eine Schulter, die hypsochrom verschoben bei ca. 465 nm liegt, also typisch für Aggregate. Besonders interessant ist der Absorptionsverlauf von **DNA17k**. Hier sieht es so aus, als gebe es kein richtiges Maximum, sondern eher ein „Dach“, welches zu gleichen Teilen der Dimer- und Monomer-Absorption gleicht.

Auch die Fluoreszenzspektren weichen deutlich ab. Die höchste Fluoreszenzintensität weist die T/T-Fehlpaarung in **DNA17l** auf. **DNA17k** emittiert ebenfalls sehr stark, was insofern überraschend ist, als dass die CylQ-Emission durch Guaninoxidation gelöscht werden kann. Dies scheint hier jedoch keine Rolle zu spielen. Zusätzlich ist das Fluoreszenzmaximum von **DNA17k** zu der etwas

intensiveren Emission von **DNA17** um 10 nm blau-verschoben und liegt bei $\lambda = 566$ nm. Interessanterweise sind **DNA17j** und **m** sind gleich stark gelöscht, was eine gewisse Systematik erkennen lässt. Alle Fehlpaarungen, welche direkt unter dem Farbstoff liegen, sind stärker gelöscht, als wenn das Uracil dazwischen liegt.

Um die Genauigkeit der Sonde weiter einzuschränken muss geklärt werden, ob Doppelfehlpaarungen in benachbarten Positionen (**DNA17n-o**) ein anderes Fluoreszenzverhalten zeigen als Einfachmutationen.

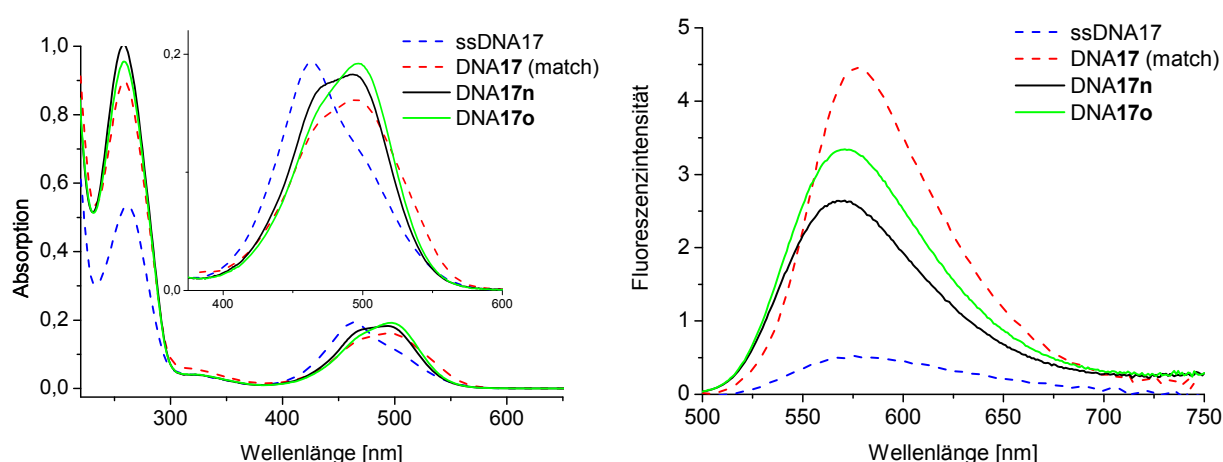


Abb. 70: Absorptions- und Emissionsspektrum von **DNA17** und **DNA17n-o** ($c = 2,5 \mu\text{M}$ in 10 mM NaPi, pH 7, 20°C, mit NaCl $c = 250$ mM, $\lambda_{\text{exc}} = 495$ nm).

Die Absorptionsspektren von **DNA17n-o** verhalten sich ähnlich wie die von **DNA17j-m** mit einer Monomer-typischen Bandenform. Die Fluoreszenzspektren der Fehlpaarungen sind beide im Vergleich zum korrekten Strang gelöscht. Das Oligomer mit der zweifachen A/G-Fehlpaarung (**DNA17n**) ist dabei etwas stärker diskriminiert. Vergleicht man **DNA17n** und **o** mit **DNA17j** und **m**, so fällt auf, dass sich die Fluoreszenzspektren stark ähneln. Dies entspricht den bisherigen Beobachtungen, dass eine Mutation in direkter Nachbarschaft zu einem CylQ-Molekül den stärksten Fluoreszenzeffekt hervorruft. Diese Positionen sind also prädestiniert für eine effiziente Detektion.

Tabelle 15: Fluoreszenzmaxima, Stokes-Verschiebung ($\lambda_A = 495$ nm), Fluoreszenzquantenausbeuten und Schmelztemperaturen von **DNA17** und **DNA17a-o** bei $\lambda = 260$ nm

DNA	$\lambda_{\text{max/F}}$ [nm]	$\Delta\lambda_{\text{F vs. A}}$ [nm]	Φ_{F}	T_{m} [°C]
ssDNA17	576	81	0,02	-
DNA17	576	81	0,09	60,0
DNA17a	576	81	0,03	61,3
DNA17b	571	76	0,05	57,4
DNA17c	577	82	0,02	57,3
DNA17d	576	81	0,03	63,8
DNA17e	570	75	0,06	57,3
DNA17f	570	75	0,03	56,7
DNA17g	576	81	0,02	61,9
DNA17h	572	77	0,06	57,8
DNA17i	573	78	0,02	58,8
DNA17j	576	81	0,05	57,1
DNA17k	568	73	0,09	57,3
DNA17l	571	76	0,12	57,0
DNA17m	576	81	0,05	57,2
DNA17n	570	75	0,06	54,7
DNA17o	571	76	0,08	55,0

Ein Blick auf die Schmelztemperaturen in Tabelle 15 zeigt, dass sich die Stabilität des korrekten Duplexes nicht sonderlich von der der Fehlpaarungen unterscheidet. Die Stränge mit Fehlpaarungen an der ersten Position sind teilweise sogar um ca. 2 °C stabiler als die an zweiter Position und die der doppelt Fehlgepaarten. Am instabilsten sind die Oligomere mit zwei Fehlpaarungen pro Strang, was nicht überrascht. Trotzdem sind auch diese mit maximal 5,3 °C Unterschied zum richtigen Strang noch relativ stabil. Diese Stabilität wird zum einen auf Aggregationseffekte der

CyIQ-Dimere zurückgeführt. Zum anderen ist die Verknüpfungsmethode über ein Nukleosid ein geringerer Eingriff in die natürliche DNA-Geometrie als z.B. ein nicht-nukleosidischer Linker und sorgt somit für mehr Stabilität. Dies wurde von unserer Gruppe in einer anderen Arbeit bereits verglichen^[73] und führte zum gleichen Ergebnis. Wenn also Duplexstabilität und Sequenzerkennung eine wichtige Rolle spielen, wie hier bei der SNP-Detektion, so ist eine Nukleosid-Verknüpfung zu bevorzugen.

Zusammenfassend ist das Ergebnis der SNP-Untersuchungen äußerst interessant. Es lässt sich mit der Fluoreszenzsonde ssDNA17 tatsächlich eine Detektion von Basenfehlpaarungen prinzipiell durchführen. Allerdings kann nicht unterschieden werden, welche Gegenbase als Fehlpaarung vorliegt. Zusätzlich kann die exakte Position bestimmt werden, da die Fluoreszenz bei einer Mutation an der ersten Position immer stärker gelöscht ist, als bei einer Mutation an der zweiten Stelle. Schwieriger wird es, wenn zwei Basen falsch gepaart sind, da dies dem Signal einer Mutation an der zweiten Position gleicht. Trotzdem lässt sich auch hier detektieren, dass überhaupt eine Mutation vorhanden ist. Bei einem Blick zurück auf die untersuchten Sequenzen und die Positionen, an denen sich eine Mutation nachweisen lässt, wird deutlich, dass dies an drei Stellen funktioniert. Drei Basen hintereinander entsprechen einem Codon, also eine für eine Aminosäure codierende Sequenz (vgl. **Abb. 71**).

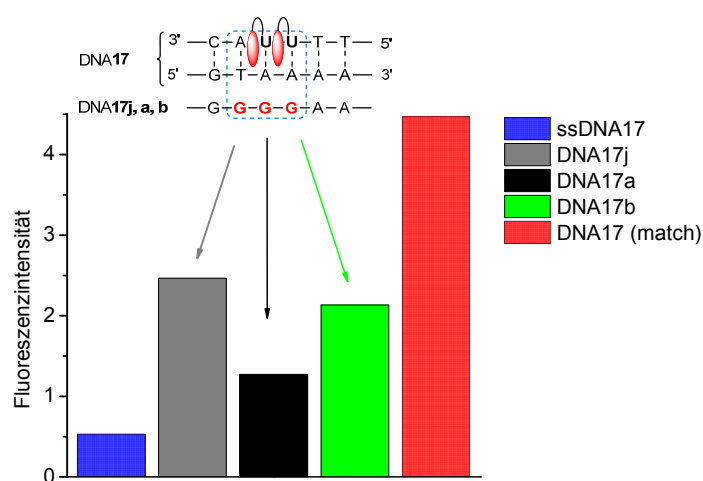


Abb. 71: SNP-Detektion für ein ganzes Codon am Beispiel von Guanin-Fehlpaarungen.

Es hat sich also gezeigt, dass CyIQ nach genauer Erforschung seiner excitonischen Wechselwirkungen in Form einer ECHO-Sonde zur Detektion von Punktmutationen geeignet ist. Es kann sogar detektiert werden, ob innerhalb eines Codons eine Mutation vorliegt. Weiterführende Arbeiten könnten diesen Ansatz präzisieren und hinsichtlich bioanalytischer Anwendungen optimieren.

5.2 Korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie

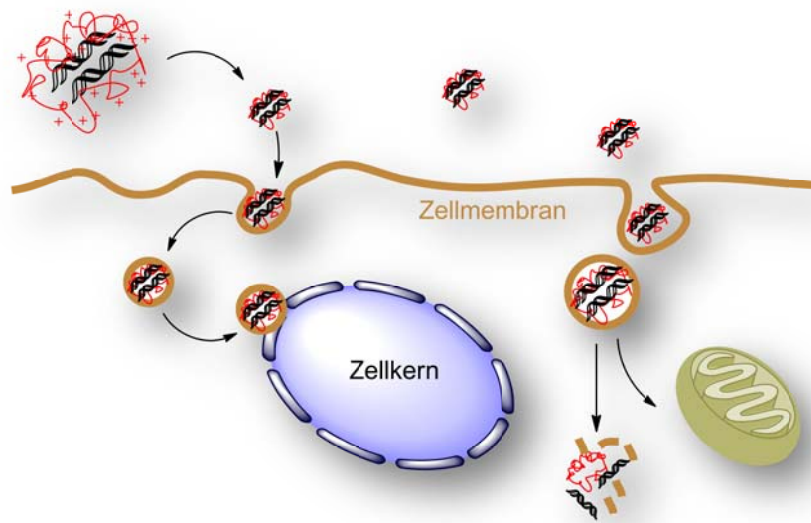


Abb. 72: Der Weg von DNA oder RNA in Zellen. Die Kombination etablierter molekularbiologischer Analytik-Methoden mit DNA-Fluorophor-Sonden ist ein neuer Ansatz, diese Prozesse zu visualisieren und zu verstehen.

Wie verläuft der Weg von DNA oder RNA in eine Zelle und wohin, zum Zellkern oder zu anderen Organellen? Diese Frage spielt für medizinische und pharmazeutische Anwendungen, wie bei der Gentherapie oder der Antisense Technologie eine entscheidende Rolle.^[280-282] Ein Hauptproblem liegt darin, die therapeutisch notwendige Menge an DNA in Zellen oder dem Zellkern zu transfizieren.^[281] Bei der Gentherapie werden dazu Nukleinsäure-Moleküle in polykationische Lipidstrukturen eingebunden, die als Transfektionshilfe dienen.^[283-286] Die daraus entstehenden Lipoplexe können die Zellmembran überwinden und den Wirkstoff in das Cytosol oder zum Nukleus transportieren.^[280] Der klinische Erfolg der Gentherapie hängt also von einem effektiven Transport ab.^[286] Bei der Entwicklung von Transfektionshilfen ist daher eine effiziente Bildgebung notwendig. Aber auch rein bioanalytisch ist es von besonderem Interesse, die genauen Wege von Oligomeren in eine Zelle und im Cytoplasma zu visualisieren und zu verstehen.

Mit der klassischen Lichtmikroskopie (LSM, *Laser Scanning Microscopy*) ist es möglich, fluoreszenzmarkierte Objekte in Echtzeit in Zellen zu verfolgen und einen zellulären Überblick zu erhalten. Zur genauen Lokalisation sind jedoch Bilder mit höherer Auflösung notwendig, die einzelne Organellen darstellen können. Dafür

eignet sich besonders die Elektronenmikroskopie (TEM, Transmissions-elektronenmikroskopie). Wie kann jedoch das Fluoreszenzsignal der Lichtmikroskopie im Elektronenmikroskop sichtbar gemacht werden? Die Forschungsgruppe um *Prof. Witzgall* vom Institut für Vorklinische Medizin der Universität Regensburg initiierte die Idee, die beiden Mikroskopie-Techniken mit etablierten Methoden der Histologie zu kombinieren und auf Nukleinsäuren zu übertragen. Die Grundidee dabei ist es, fluoreszenzmarkierte DNA oder RNA durch eine Transfektionshilfe (Lipofectamin™ 2000) neben einem Chromogen (DAB, 3,3'-Diaminobenzidin) in Zellen zu schleusen. Nach der Inkubation wird das DAB photoinduziert zur Polymerisation gebracht, wodurch ein lokaler Polymerkomplex mit hoher Elektronendichte entsteht, der im TEM besonders gut zu erkennen ist. Da die Reaktion nur dort stattfinden kann, wo sich die DNA-Fluorophorsonde befindet, kann die Position der Nukleinsäure exakt bestimmt werden. Der Mechanismus der photoinduzierten Polymerisation ist noch nicht vollständig verstanden.^[287-289] In aktuelleren Untersuchungen mit anderen Chromophoren^[288, 290] wie z. B. Eosin^[291] konnte jedoch gezeigt werden, dass Singulett Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) und Sauerstoffradikale ($\text{O}_2^{\cdot-}$) die entscheidenden Initiatoren der DAB-Polymerisation sind. Diese reaktiven Sauerstoffspezies werden in situ durch photoangeregte Zustände des Farbstoffs gebildet (s. **Abb. 73**). Aber auch direkte Elektronentransferprozesse zwischen Farbstoff und DAB (z. B. via $\text{DAB}^{+\cdot}$) sind denkbar, da DAB ($E_{\text{ox}} = 0,53 \text{ V}$ vs. NHE) ein guter Elektronendonator ist.^[291] Eine solche Reaktion ist damit auch für CylQ möglich, das mit einem Reduktionspotential im angeregten Zustand ($E_{\text{red}}^* = 1,6 \text{ V}$) nach der Rehm-Weller-Gleichung ($\Delta G \approx -1,1 \text{ eV}$) in der Lage ist DAB zu oxidieren (vgl. Kapitel 4.2.2).

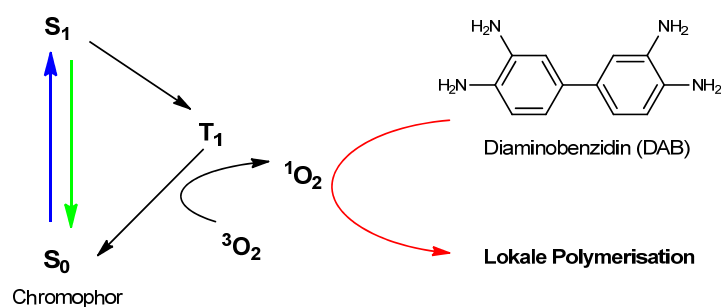


Abb. 73: Die photoinduzierte DAB-Polymerisation wird hauptsächlich durch reaktive Sauerstoffspezies angestoßen. Hier am Beispiel von Singulett Sauerstoff ($^1\text{O}_2$), der in situ durch den photoangeregten Zustand eines Chromophors gebildet wird. Abbildung nach Vorbild von *Shu et al.*^[290]

Die Idee der Photoreaktion mit Chromogenen und der damit verbundenen Möglichkeit der lokalen Elektronenmikroskopie wurde erstmals 1982 von *Maranto et al.* an Neuronen beschrieben.^[292] Es gibt eine Reihe weiterer Beispiele, bei denen diese korrelative Technik z. B. mit fluorophormarkierten Proteinen^[293] oder Lipiden zur Anwendung kam.^[290, 294, 295] Es sind jedoch nach sorgfältiger Literaturrecherche keine Anwendungen mit DNA-Fluorophor-Sonden bekannt. Der in dieser Arbeit entwickelte CyIQ-Chromophor scheint wie geschaffen für eine derartige Anwendung. Er ist äußerst photostabil, kann kovalent in die DNA gebunden werden und hat ein hohes Oxidationspotential. Zusammen mit der Forschungsgruppe von *Prof. Göpferich*, die besondere Erfahrung auf dem Gebiet der RNA-Transfektion hat, ergab sich eine äußerst vielversprechende Kooperation. Im Folgenden werden CyIQ-DNA-Sonden, die wie in Kapitel 4.1 beschrieben synthetisiert wurden, und die damit erzielten Ergebnisse erläutert.

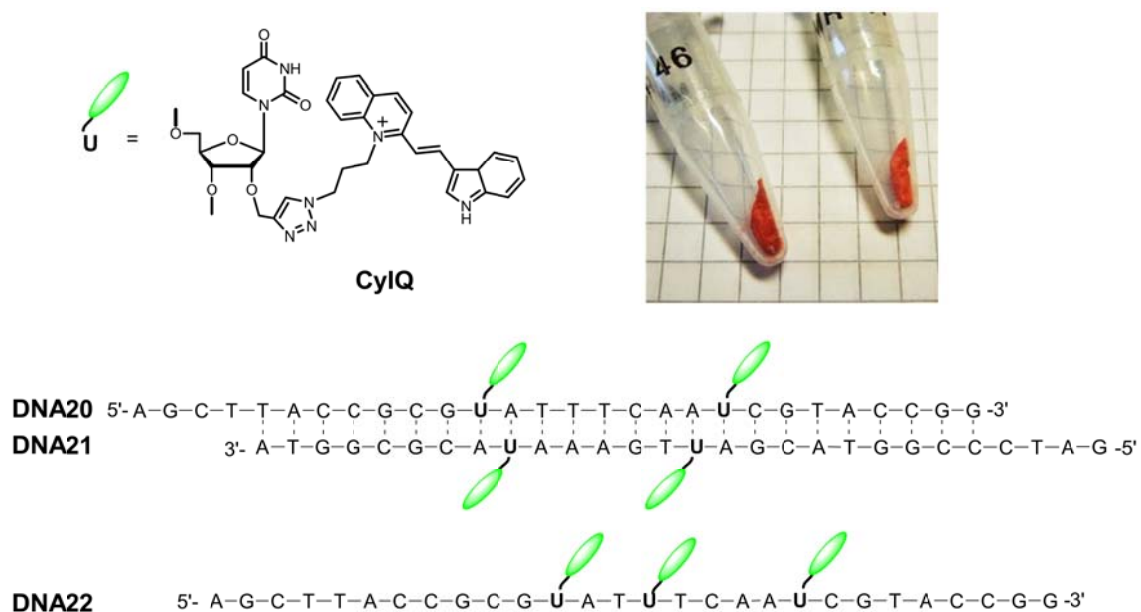


Abb. 74: Synthetisierte CyIQ-DNA-Sonden für die korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie. **DNA20** und **21** sind jeweils doppelt markiert und komplementär zueinander. **DNA22** ist dreifach modifiziert. Die lyophilisierte DNA zeigt eine kräftige orange-rote Färbung (Foto).

Um eine besonders starke Helligkeit der Sonde zu erreichen, wurden doppelt markierte Oligomere hergestellt. Die Sequenz wurde dabei so gewählt, dass sie komplementär zu einem ebenfalls doppelt markierten DNA-Strang ist, um sowohl

Einzel- als auch Doppelstrang-Sonden verwenden zu können. Die Enden des Duplexes hängen dabei an beiden Seiten über und bilden sogenannte „sticky ends“, was eine enzymatische Ligation in Plasmid-Vektoren ermöglicht. Die gewählte DNA-Sequenz besitzt keine gezielte Interferenz-Information. Die Möglichkeit, CylQ innerhalb der DNA-Sequenz an eine intakte Base zu knüpfen, stellt hierbei einen Vorteil im Vergleich zu terminalen Verknüpfungstechniken dar, da die Basenpaarung intakt bleibt und möglicherweise die Enzymakzeptanz erhalten bleibt.

DNA20 und Lipofectamin ergeben zusammen partikuläre Lipoplexe die mit einer Kultur aus Epithelzellen der Schweineniere (LLC-PK1) für insgesamt 31 Stunden inkubiert wurden. Nach Fixierung mit Glutaraldehyd wurde den Zellkulturen das DAB zugegeben. Bereits bei der Lichtmikroskopie machte sich die herausragende Photostabilität von CylQ bemerkbar. Die Transfektion konnte in Echtzeit über einen Zeitraum von bis zu 30 Minuten verfolgt werden. Manche Farbstoffe wie z. B. Rhodamine bleichen hier bereits nach einer halben Minute aus.^[225] Auf den Bildern des Fluoreszenzmikroskops ist deutlich die CylQ Emission in partikelartigen Strukturen zu erkennen (grüne Punkte). Dabei sind die Signale sowohl extra- als auch intrazellulär zu erkennen. In **Abb. 75b** und **Abb. 77c** sind fluoreszierende Lipoplexe am Zellkern zu erkennen.

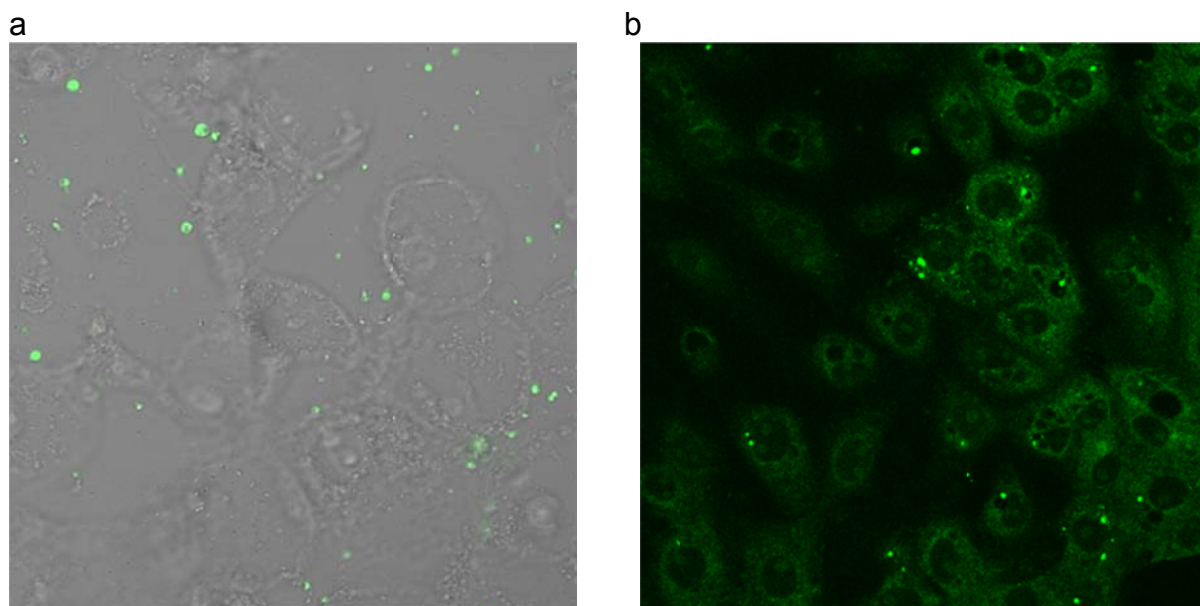


Abb. 75: Übersichtsaufnahmen der Zellen nach Inkubation mit Lipoplexen aus **DNA20** und Lipofectamin. **a)** Überlagerung aus Hellfeld- und Fluoreszenzaufnahme; **b)** Life-Bild im LSM. Deutlich zu erkennen ist die punktartige Fluoreszenz der Sonde, teilweise auch am Zellkern ($\lambda_{\text{exc}} = 480 \text{ nm}$).

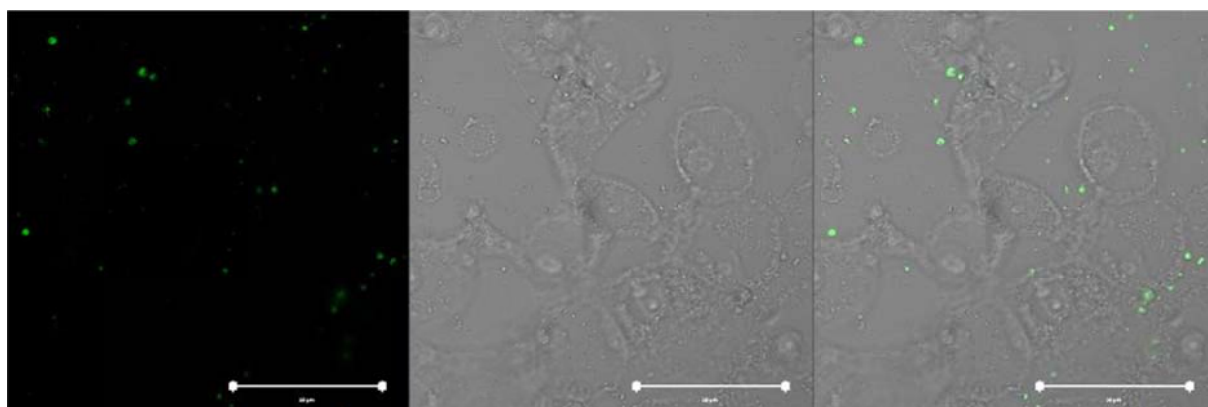


Abb. 76: Fluoreszenz, Hellfeld und überlagerte Aufnahme (v. l. n. r.) der Zellen zur Verdeutlichung der optischen Eigenschaften der CylQ-Sonde. Skala 50 µm; $\lambda_{\text{exc}} = 480 \text{ nm}$

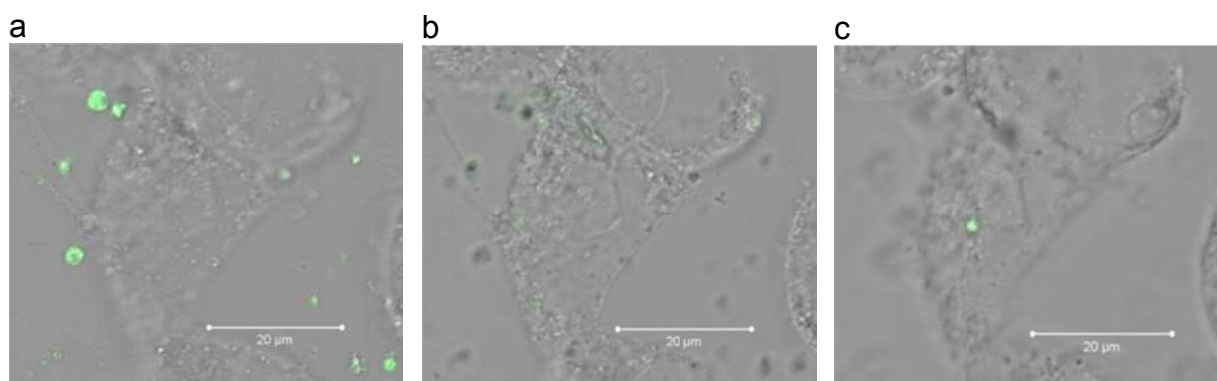


Abb. 77: Vergrößerte Schichtaufnahmen (Z-Ebene) einer einzelnen Zelle. **a)** In dieser Position sind besonders deutlich extrazelluläre Lipoplexe an ihrer Fluorezenz (grün) zu erkennen. **b)** In dieser Position ist der Zellkern gut zu erkennen. **c)** In der untersten Raster-Ebene ist deutlich ein punktartiges Fluoreszenzsignal in der Nähe des Zellkerns sichtbar (Skala 20 µm; $\lambda_{\text{exc}} = 480 \text{ nm}$).

Aus den LSM-Bildern geht hervor, dass die DNA-Sonden das Zellinnere erreichen und dort verlässliche Fluoreszenzsignale liefern. Dies zeigt, dass bis zu diesem Punkt die entwickelten Sonden mit den verwendeten Methoden kompatibel sind. Im nächsten Schritt findet nun die Verknüpfung mit der Elektronenmikroskopie statt. Dazu wurden Zellschnitte angefertigt und im TEM betrachtet. Durch die Photooxidation von DAB durch CyIQ sollten die Stellen, an denen sich die DNA-Lipoplexe befinden, schwarz kontrastiert erscheinen. Genau das ist sehr deutlich zu beobachten (s. **Abb. 78**).

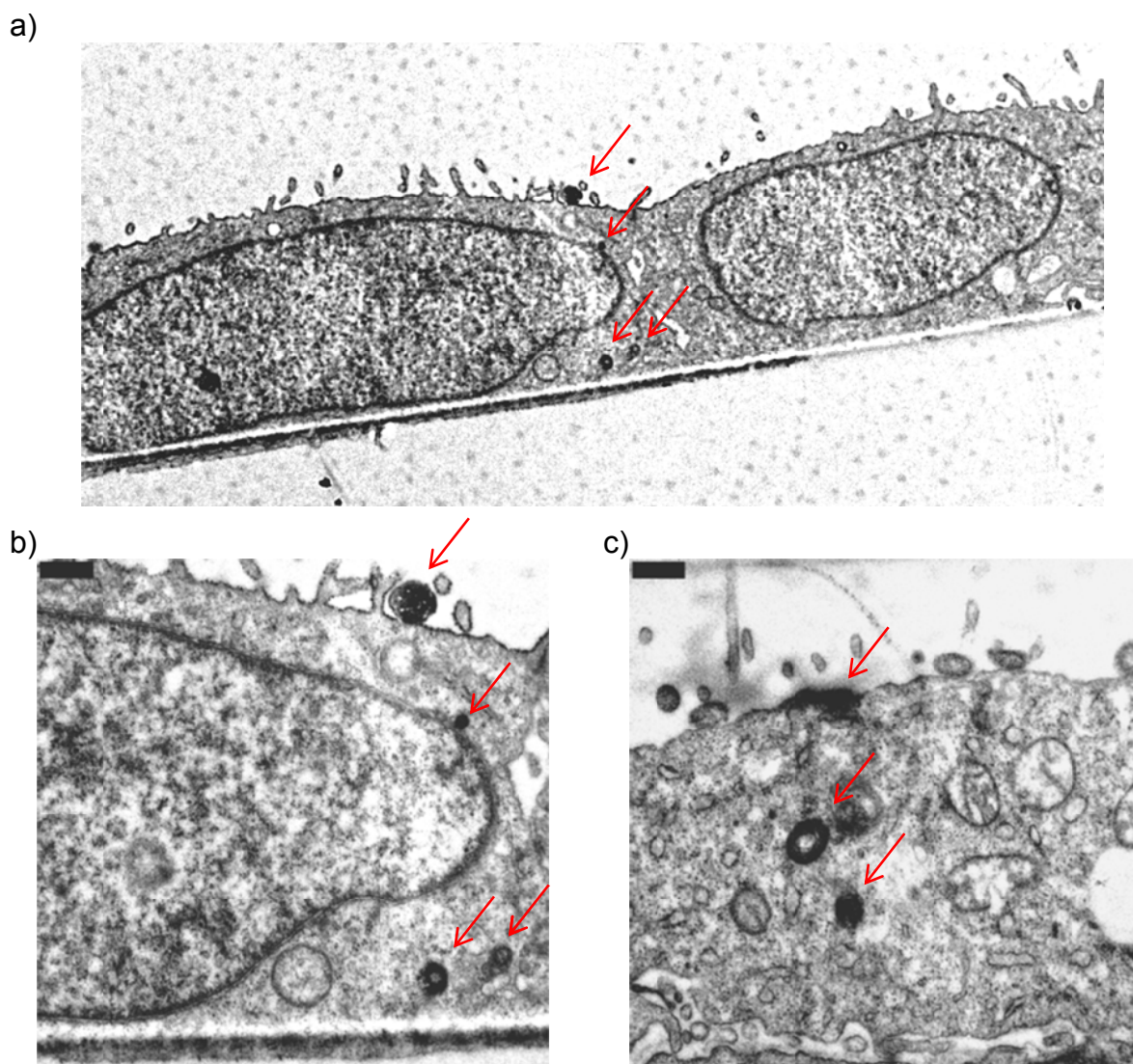


Abb. 78: TEM Aufnahmen von Zellschnitten der im LSM untersuchten Zellen. **a)** Übersichtsaufnahme in der deutlich die Zellkerne zweier LLC-PK1 Zellen mit basaler und apikaler Seite zu erkennen sind. Bereits hier sind deutlich die dunkel gefärbten Lipoplexe zu erkennen. **b)** Vergrößerung einer Zelle, bei der deutlich die schwarz gefärbten Sonden zu sehen sind. **c)** Vergrößerung einer Zelle, bei der deutlich an der Membran und in der Zelle dunkle Lipoplexe auffallen.

Die TEM Bilder zeigen sehr eindrücklich die mit starkem Kontrast gefärbten Stellen der DAB-Polymerisation und damit die Stellen der Lipoplexe mit der DNA-Sonde. Besonders deutlich können in **Abb. 78b** mehrere Orte der DNA lokalisiert werden. Sie befinden sich sowohl extrazellulär an der Membran als auch intrazellulär und sogar direkt am Nukleus. Es wurde aber bisher keine Sonde innerhalb des Zellkerns gefunden. Zusätzlich konnte über eine FACS-Analyse eine Transfektionsrate von bis zu 50 % für **DNA20** bestimmt werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass CylQ-DNA Sonden aufgrund ihrer speziellen photophysikalischen Eigenschaften (Photostabilität; Redoxverhalten) besonders gut für den Einsatz in der korrelativen Licht- und Elektronenmikroskopie geeignet sind. Sie bieten damit ein enormes Potential für derartige bioanalytische Anwendungen, weil sie deutliche Vorteile zu herkömmlicher fluoreszenzmarkierter DNA aufweisen.

7 DNA-funktionalisierte Upconversion-Nanopartikel

Durch die Kombination von DNA mit Upconversion-Nanopartikeln sollen die Eigenschaften beider Bausteine miteinander verknüpft werden. Upconversion-Nanopartikel (UCNPs) sind aufgrund ihrer außergewöhnlichen optischen Eigenschaften wie geschaffen für bioanalytische und medizinisch-diagnostische Anwendungen.^[150, 296] Die Emission von sichtbarem Licht bei Anregung im energiearmen IR-Bereich ($\lambda = 980 \text{ nm}$) ermöglicht zugleich eine hohe Eindringtiefe in biologisches Material bei nahezu keinerlei Hintergrundfluoreszenz.^[149, 297]

Eine Verknüpfung mit DNA ist aus vielerlei Hinsicht interessant. Die DNA als Biomaterial dient zum einen der molekularen Erkennung^[169, 298] und zum anderen der Verbesserung der Biokompatibilität.^[299] Da DNA selbst in zellulären Prozessen eine wichtige Rolle spielt, bildet eine Verknüpfung mit DNA die Grundlage für Nanopartikel basierte Nukleinsäure-Analytik.^[152, 300] Manche Nanopartikel sind in der Lage, Zellmembranen zu überwinden, womit sie den Weg zu intrazellulären Prozessen eröffnen.^[137] Sie stellen somit als nicht-virale Vektoren eine Möglichkeit dar, DNA zu analytischen oder therapeutischen Zwecken in den Intrazellulärraum einzuschleusen.^[301] Auch für den Bereich der Biosensoren^[154, 302] und Biochips^[153] sind Nanopartikel-DNA-Konjugate eine vielversprechende Erweiterung. Die genauen Hintergründe und relevante Forschungsergebnisse zu Upconversion-Nanopartikeln und DNA-funktionalisierten Nanopartikeln finden sich in Kapitel 3.4.

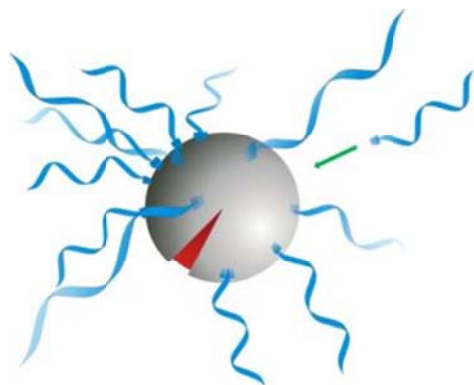


Abb. 79: Illustration der Oberflächenfunktionalisierung (grau) von Upconversion-Nanopartikeln mit DNA.

Im Folgenden soll ein neuartiger Ansatz zur Kombination von Upconversion-Nanopartikeln mit DNA entwickelt und validiert werden. Dabei soll erstmals DNA an die Oberfläche von Upconversion-Nanopartikeln durch eine Klick-Reaktion immobilisiert werden. Dieses Projekt ist durch eine Kooperation mit der Forschungsgruppe um *Prof. Wolfbeis* entstanden. Die Gruppe entwickelte in den letzten Jahren unter vielen andern auch azidmodifizierte Nano-

partikel.^[303] Diese eignen sich gut für eine kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition nach *Huisgen*, *Sharpless* und *Meldal*, wie sie in dieser Arbeit bereits erfolgreich und standardmäßig für den CylQ-Chromophor angewendet wurde (vgl. 4.1.4). In einem ersten Schritt galt es somit, eine reproduzierbare Methode für die Klick-Konjugation und anschließender Reinigung zu entwickeln. In einem zweiten Schritt werden die Konjugate charakterisiert, um anschließend deren grundlegendes Verhalten in Bezug auf Zellen und Ziel-DNA zu untersuchen.

7.1 Methodenentwicklung

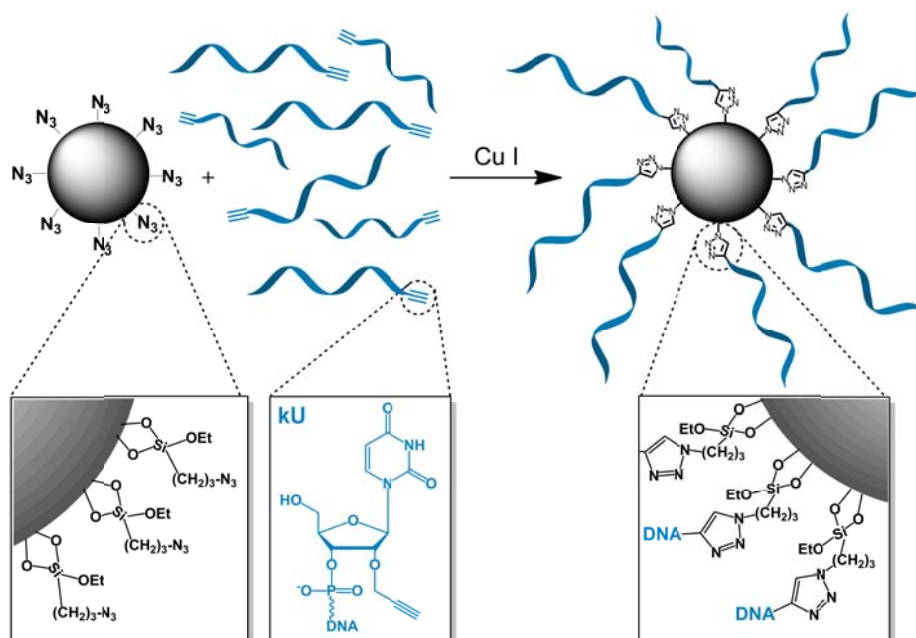


Abb. 80: Schematische Darstellung der Klick-Konjugation von DNA mit Upconversion-Nanopartikeln. Die Oberfläche der Nanopartikel ist azidfunktionalisiert. Das entsprechende Alkin wird über das modifizierte Uridin (kU) in die DNA eingebaut und liegt am 3'- oder 5'-Ende des Oligomers.

Die Grundidee der Klick-Konjugation von DNA mit Upconversion-Nanopartikeln ist es, eine universelle, reproduzierbare und zuverlässige kovalente Verknüpfungsmethode zu entwickeln, die eine äußerst dichte Oberflächenbelegung des Partikels mit DNA liefert. Da die Klick-Reaktion zwischen einem Alkin und einem Azid bioorthogonal verläuft, ist sie wie geschaffen für die Verknüpfung biologischer Makromoleküle wie DNA.^[45, 54] Der Begriff der „Klick“-Chemie wurde dabei durch *Barry Sharpless* geprägt.^[182] Ursprünglich fasste er unter diesem Begriff eine ganze Reihe von Reaktionen zusammen, im Rahmen welcher unter milden Bedingungen eine Verknüpfung aus einfach aufgebauten Molekülen möglich ist. Zur selben Zeit wie *Meldal*^[52] entdeckte auch *Sharpless*,^[51] dass die 1,3-dipolare Cycloaddition zwischen einem Azid und einem Alkin effektiv durch Kupfer Ionen katalysiert werden kann und dabei regioselektiv 1,4-disubstituierte Triazole ergibt. Damit war es plötzlich möglich diese Art von Klick-Reaktion bei Raumtemperatur und im wässrigen Milieu durchzuführen. Auf dieser Reaktion baut auch dieses Projekt auf. Die Hintergründe

zur Klick-Reaktion und ihr Weg in die DNA-Chemie sind in Kapitel 4.1.4 Klick-Konjugation beschrieben.

Für die Konjugation mit Upconversion-Nanopartikeln wurden Oligomere synthetisiert, die eine Alkin-Gruppe entweder am 3'- oder 5'- Ende der DNA tragen. Dafür wurde das bereits etablierte 2'-O-Propargyl-Uridin (kU, klick-Uridin) als artifizielle Base synthetisiert und an die jeweilige Position der DNA eingebaut (s. Kapitel 4.1.2 und 4.1.3). Die Synthese von 3'-modifizierter DNA konnte nicht standardmäßig durchgeführt werden. Hierfür wurde mit einem sog. „*Universal Support*“ gearbeitet, bei dem anstatt eines Nukleosids ein basenlabiler Spacer mit terminaler DMT-Gruppe auf der festen Phase immobilisiert ist. Als erste Base wurde dann das kU als Phosphoramidit eingebaut. Nach üblicher Abspaltung und Aufarbeitung der DNA liegen aber sowohl die 3'- als auch die 5'-modifizierten Oligomere mit terminaler OH-Gruppe vor und entsprechen bis auf die Alkin-Gruppe der natürlichen DNA. Folgende Stränge wurden auf diese Weise synthetisiert:

DNA23	5'- kU -C-A-G-T-G-A-T-C-T-A-G-A-C-T-G-C- 3'
DNA24	3'- C-G-T-A-C-G-A-T-A-T-A-G-C-A-T-G- kU - 5'
DNA25	3'- A-G-T-A-C-G-A-T-A-T-A-G-C-A-T-G- kU - 5'
DNA26	5'- kU -C-A-T-G-C-T-A-T-A-T-C-G-T-A-C-A- 3'
DNA27	3'- A-G-T-C-A-C-T-A-A-A-T-C-T-G-A-C- kU - 5'

Vor der Verknüpfung mit den Nanopartikeln wurden die modifizierten Oligomere über HPLC gereinigt, um zu gewährleisten dass ausschließlich komplette DNA-Stränge an die Partikel geknüpft werden. Dadurch ist es zusätzlich möglich, die exakte Stoffmenge an DNA vor und nach der Klick-Reaktion zu bestimmen und somit die Effizienz der Kupplung zu beurteilen.

Alle in dieser Arbeit verwendeten Upconversion-Nanopartikel stammen aus dem Arbeitskreis *Prof. Wolfbeis* des Instituts für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik der Universität Regensburg. Sie wurden von *Daniela Achatz* und *Heike Mader* nach der Co-Präzipitationsmethode hergestellt.^[145, 303] Die Partikel sind vom Typ NaYF₄ und wurden mit Yb³⁺ als Sensibilisator, und Er³⁺ als emittierendes Aktivator Ion co-dotiert.

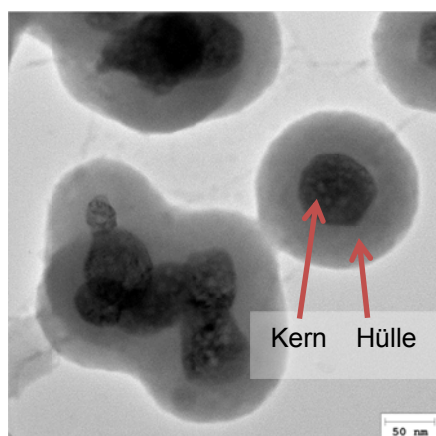


Abb. 81: Links: Typische Upconversion Nanopartikel in dieser Arbeit. Deutlich zu unterscheiden der Kern (NaYF_4) und die Silica-Hülle. Synthesebedingt können auch mehrere Kerne zusammen mit Silica überzogen sein und zu einem großen Partikel verschmelzen (links im Bild). Größenskala: 50 nm. Rechts: Bei Anregung mit einem IR-Laser ($\lambda = 980 \text{ nm}$) emittieren die hier verwendeten UCNPs am stärksten grünes Licht bei 540 nm.

Der Kern der Partikel wurde in einem Stöber Prozess mit einer Schicht aus SiO_2 überzogen und gleichzeitig azidofunktionalisiert (2-Azidoethyl-trimethyl Orthosilicat). Die Nanopartikel weisen eine Größenverteilung von 60 – 90 nm auf und liegen in wässriger Kolloiddispersion vor. Bei Anregung mit $\lambda = 980 \text{ nm}$ zeigen die Partikel drei Absorptionsbanden mit Maxima bei $\lambda = 520, 540$ und 655 nm .

Die Klick-Reaktion mit DNA unterscheidet sich geringfügig von herkömmlichen Klick-Reaktionen. Kupfer-Ionen können DNA oxidativ schädigen und Strangbrüche erzeugen.^[193-195] Die Klick-Reaktion wurde insgesamt analog zu der bewährten Klick-Reaktion des CyIQ-Chromophors durchgeführt, das heißt mit einem *Tetrakis-(acetonitril)-kupfer(I)-hexafluorophosphat*-Komplex, dem Cu(I)-stabilisierenden Liganden (TBTA) und Na-Ascorbat (s. 10.6.2). Wie sich herausstellen wird, sind diese Reaktionsbedingungen auch für die Nanopartikel Konjugation mit DNA bestens geeignet.

Für die Klick-Reaktion wurden üblicherweise Upconversion-Nanopartikel mit einem Partikelgehalt von 1 – 2 mg/mL in wässriger Dispersion verwendet. Bei der Klick-Reaktion ist darauf zu achten, bei keinem Schritt zu zentrifugieren, da die DNA-Nanopartikel nicht oder nur schwer resuspendiert werden können. Anstatt der üblichen DNA-Präzipitation mit Ethanol muss daher alternativ aufgearbeitet werden (s. Reinigung). Es wurde stets ein Überschuss an DNA für die Reaktion eingesetzt,

um eine möglichst quantitative Umsetzung und damit dichte Oberflächenfunktionalisierung zu erhalten.

Nach den ersten erfolgreichen Klick-Reaktionen wurden TEM-Bilder angefertigt, um die Morphologie der Nanopartikel vor und nach der Reaktion zu vergleichen. Auf den Bildern nach der DNA-Verknüpfung fiel eine gewebeartige Struktur auf, die um die Nanopartikel angereichert ist (**Abb. 82b**). Dabei handelt es sich um überschüssige DNA, die vermutlich durch nichtspezifische, teilweise selbstkomplementäre Wechselwirkungen dort haftet oder adsorbiert ist.

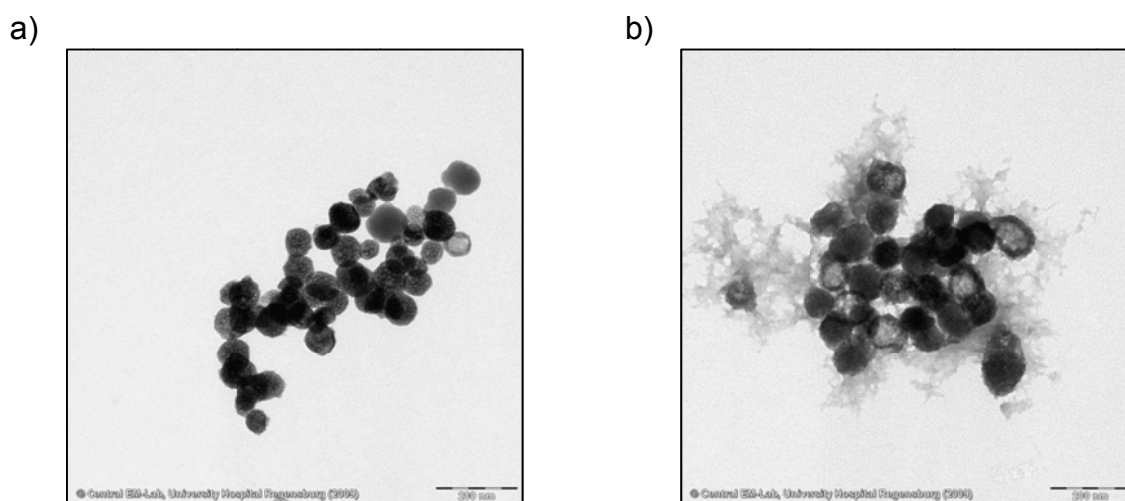


Abb. 82: TEM-Bilder von Upconversion-Nanopartikeln vor der Klick-Konjugation mit DNA (a) und danach (b). Man kann deutlich die überschüssige DNA um die Nanopartikel erkennen. Vergrößerung (a und b): 40000fach, Größenskala 200 nm.

Es war schnell klar, dass eine Methode zur Entfernung der überschüssigen DNA erarbeitet werden muss. Typische Methoden zur DNA-Reinigung wie HPLC oder Gelelektrophorese kommen nicht in Frage, da diese Methoden nicht mit Nanopartikeln kompatibel sind. Die Lösung fand sich in der Gel-Permeations-Chromatographie (GPC), oft auch als Größenausschlusschromatographie (SEC) bezeichnet. In dieser Arbeit wurde die Chromatographie für 60 °C optimiert. Bei dieser Temperatur dehybridisieren Bereiche selbstkomplementärer DNA und können nun auf der Säule getrennt werden (Schmelzpunkt eines kompletten Referenzduplexes: 63 °C). Das GPC-Gel wurde mit einem Ausschlusslimit für 20 Basen gewählt, das heißt, dass DNA-Moleküle und Fragmente der verwendeten Oligomere (17 Basen) sicher abgetrennt werden. Die Trennleistung der Säule bei 60 °C wurde

anhand eines fluoreszenzmarkierten (CylQ) Duplexes überprüft, der zu UCNP-DNA hybridisiert wurde. TEM-Bilder die nach der Aufreinigung mit dieser Methode gemacht wurden, zeigten keine sichtbare überschüssige DNA mehr. Auch durch Absorptionsspektroskopie konnte keine DNA mehr im wässrigen Überstand gefunden werden, wenn die Nanopartikel zentrifugiert wurden. Die nicht verknüpfte Überschuss-DNA findet sich im Nachlauf der GPC und lässt sich massenspektroskopisch auch als solche nachweisen.

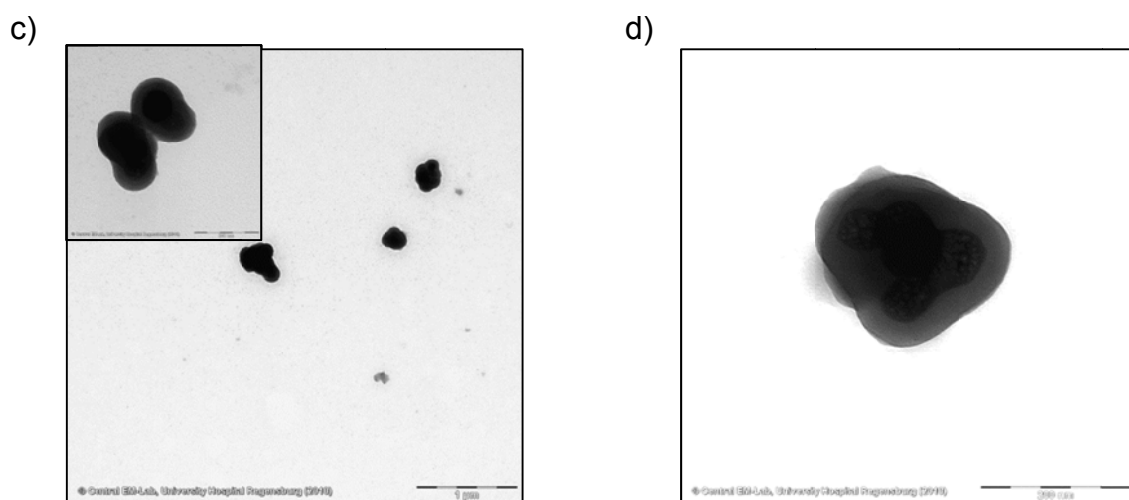


Abb. 83: TEM-Bilder von UCNP-DNA nach der Aufreinigung über GPC (c). Vergrößerung eines Partikels (d). Vergrößerung (c): 40000fach, Größenskala 1 μm und 80000fach kleines Bild, Größenskala 200 nm; Vergrößerung (d): 80000fach, Größenskala 200 nm.

7.2 Charakterisierung

Zunächst war es wichtig, die erfolgreiche Verknüpfung der DNA und der Klick-Reaktion nachzuweisen. Hier zeigt sich ein Vorteil der Azid-Alkin-Cycloaddition. Die stark IR-aktive Azid-Bande und deren Umsetzung zum 1,4-Triazol kann spektroskopisch am Verschwinden der N_3 -Bande verfolgt werden. Da die Proben in pulverartigem Zustand gemessen werden, greift man typischerweise auf eine materialwissenschaftliche IR-Methode zurück, die DRIFT-Spektroskopie. Die *Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy* (DRIFT) ist eine quantitative IR-Methode, bei der das diffus reflektierte Einstrahlungslicht einer rauen Oberfläche detektiert und analysiert wird.

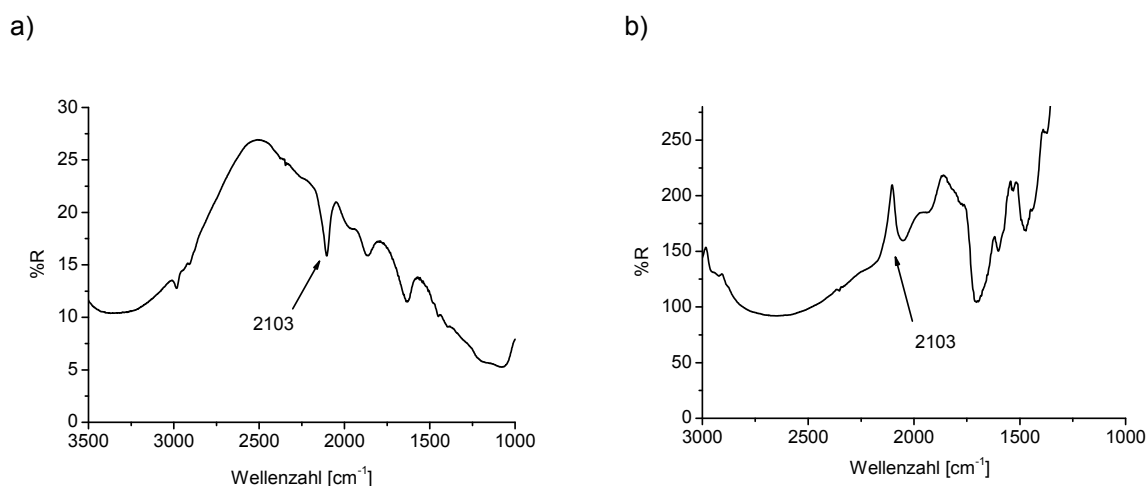


Abb. 84: IR-Spektren nach der DRIFT-Methode. **a)** Azid funktionalisierte UCNPS vor der Klick-Reaktion. **b)** UCNP-DNA-Konjugate nach der Klick Reaktion.

Die Spektren zeigen deutlich den Unterschied. Für das Spektrum nach der Klick-Reaktion wurde das Edukt-Spektrum subtrahiert. Somit wird der quantitative Umsatz bei 2103 cm^{-1} deutlicher, da sich die Bande umkehrt. Ein spektroskopischer Nachweis der DNA-Verknüpfung ist z. B. bei einer affinitätsbasierten Kombination aus Streptavidin und Biotin nicht möglich.

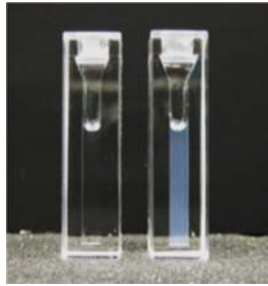


Abb. 85: Upconversion-Nanopartikel die mit DNA modifiziert wurden zeigen eine bessere Löslichkeit (linke Küvette) als reine UCNPs (rechte Küvette).

Schon bei den ersten Versuchen mit DNA funktionalisierten Upconversion-Nanopartikeln zeigt sich ein interessanter Effekt: Upconversion-Nanopartikel liegen normalerweise in einer trüben wässrigen Dispersion vor. Die Konjugate mit DNA sind jedoch deutlich besser löslich und liegen in wässrigem Phosphatpuffer als klare Lösung vor. Diese Eigenschaft verwundert nicht allzu sehr, wenn man den stark hydrophilen Charakter des Polyanions DNA bedenkt. Durch die sehr dichte Oberflächenbeladung kommt hauptsächlich der polare hydrophile Charakter der DNA zum Tragen und verbessert die Löslichkeit des gesamten Partikels. Dieser Effekt ist für Nanomaterialien bekannt.^[164, 298]

Um festzustellen, ob die DNA auf den Nanopartikeln in üblicher Weise vorliegt und auch reagiert, wurden zwei klassische Experimente durchgeführt. Eine Fluoreszenztitration von Doppelstrang-DNA mit Ethidiumbromid und eine Schmelztemperaturmessung mit Vergleichsprobe.

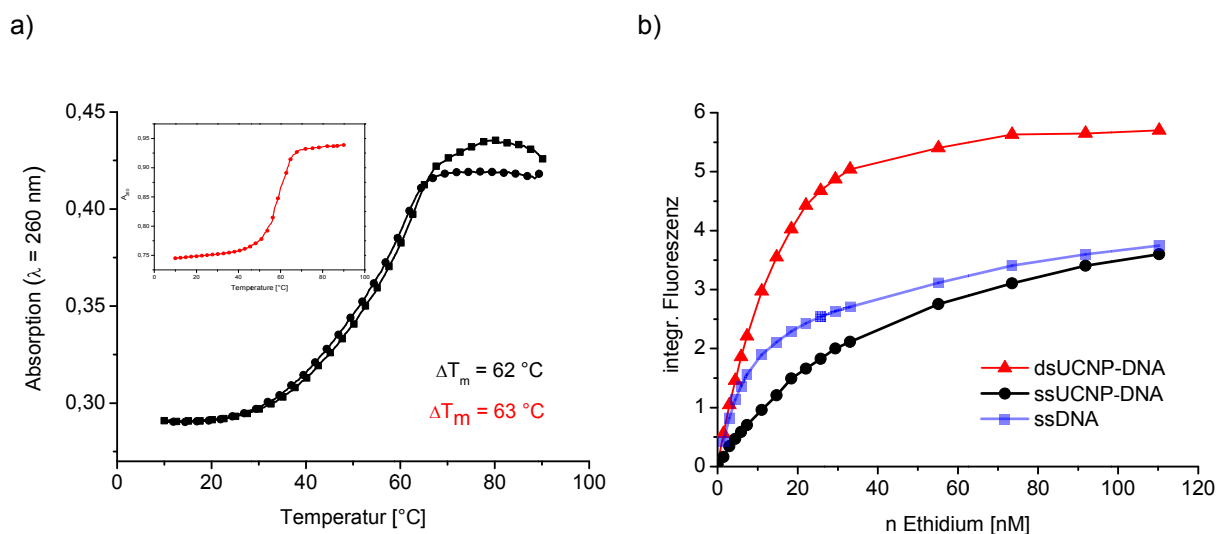


Abb. 86: **a)** Schmelztemperaturkurven von UCNP-DNA mit einem unmodifizierten Gegenstrang (schwarz) und die Kurve des Referenzduplex ohne Nanopartikel (rot, kleines Graph). **b)** Fluoreszenztitration mit Ethidiumbromid (EB-Stammlösung: 735 μM).

Die kooperative thermische Dehybridisierung der DNA-Doppelhelix liefert aufgrund des *hyperchromen* Effekts eine charakteristische Kurve bei $\lambda = 260$ nm. DNA modifizierte Nanopartikel sollten den gleichen Kurvenverlauf zeigen, wenn sie in der Lage sind, einen Gegenstrang zu binden. Genau dieses Verhalten zeigen auch die DNA-funktionalisierten Upconversion-Nanopartikel (**Abb. 86a**). Nach Zugabe eines komplementären Gegenstrangs ist eine typische Schmelzkurve mit fast identischem Schmelzpunkt, verglichen mit einem normalen DNA-Strang, zu sehen. Der immer noch sehr scharfe Kurvenverlauf wird auch bei anderen DNA-Nanopartikel-Konjugaten beobachtet^[304] und ist ein Hinweis für eine sehr hohe Oberflächenbelegung mit DNA.^[305]

Um dies auch optisch zu charakterisieren, wurde eine Fluoreszenztitration mit Ethidium-Bromid (EB) durchgeführt. EB zeigt speziell in doppelsträngiger DNA einen starken Fluoreszenzanstieg^[198] und wird seit Jahrzehnten in der DNA-Analytik verwendet.^[306, 307] In diesem Versuch wurden einzelsträngige UCNP-Konjugate mit Doppelsträngigen verglichen, indem schrittweise Ethidium-Bromid-Lösung zutitriert wurde. Ein normaler DNA-Einzelstrang dient als Referenz. Dabei zeigt nur die Doppelsträngige DNA-Nanopartikel Probe den typischen Fluoreszenzanstieg von Ethidium (vgl. **Abb. 86b**). Die beiden Einzelstränge verhalten sich gleich und zeigen nur halb so viel Fluoreszenz. Die DNA modifizierten UCNPs haben also DNA-typische Eigenschaften und sind somit für derartige Anwendungen einsetzbar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine neuartige Methode erarbeitet wurde, die es ermöglicht, saubere DNA-funktionalisierte Upconversion-Nanopartikel aus einer kupferkatalysierten Cycloaddition von Aziden mit Alkinen zu erhalten. Aus allen Untersuchungen geht hervor, dass die Klick-Reaktion zwischen DNA und Upconversion-Nanopartikel erfolgreich war, die Oligomere auf der Oberfläche der Partikel dicht angeordnet sind, in typischer Weise reagieren und für Ziel-DNA adressierbar sind. Diese grundlegenden Erkenntnisse ermöglichen nun die Anwendung in ersten bioanalytischen Versuchen und weiteren Untersuchungen.

8 Anwendungen von UCNP-DNA Konjugaten

8.1 Quervernetzung durch Ziel-DNA

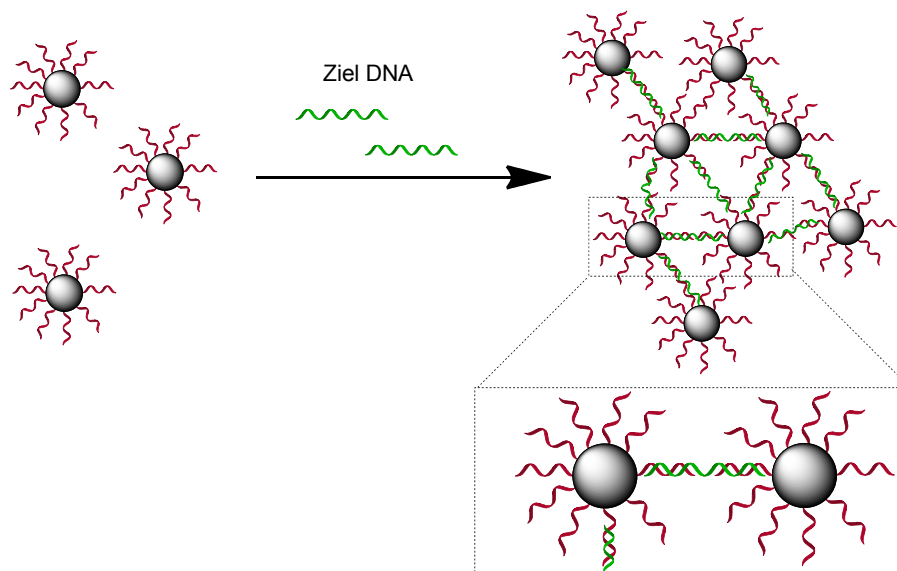


Abb. 87: Schema zur Vernetzung DNA-funktionalisierter Nanopartikel durch komplementäre Ziel-DNA.

Eine der faszinierendsten Eigenschaften der DNA ist ihre rein sequenzabhängige Hybridisierung mit komplementären Gegensträngen zu doppelhelikalen Strukturen. Dieses hochspezifische und zielsichere Verhalten ist einzigartig und bietet ein großes Potential für DNA-Nanopartikel-Konjugate in bioanalytischen und materialwissenschaftlichen Anwendungen.^[308] Über die DNA können einzelne Nanopartikel miteinander reversibel verknüpft und vernetzt werden. Man spricht auch von funktionellen Nanopartikeln. Eine Pionierarbeit zu dieser Idee stammt von *Chad Mirkin*, der bereits 1996 DNA-modifizierte Gold-Nanopartikel über einen DNA-Doppelstrang mit kohäsiven Enden zu makroskopischen Clustern vernetzte.^[309] Seither wurde eine ganze Reihe von Arbeiten veröffentlicht, die sich das Prinzip der DNA-vermittelten Selbstorganisation von Nanopartikeln zu Nutze macht.^[163, 308, 310] Dabei entstanden einige sehr interessante bioanalytische und materialwissenschaftliche Anwendungen, von denen eine repräsentative Auswahl in Tabelle 16 zusammengefasst ist.

Tabelle 16: Übersicht unterschiedlicher Anwendungen von DNA gesteuerten Nanopartikel Netzwerken.

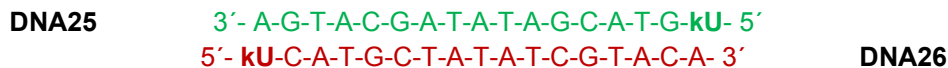
Art der Nanopartikel	Lit.	kurze Beschreibung
Au	[311]	Erster quantitativer und kolorimetrischer DNA-Nachweis durch DNA vermittelte Quervernetzung.
Au	[312]	Kolorimetrisches Echtzeit-Screening der Aktivität unterschiedlicher Endonuklease-Inhibitoren.
Au	[313]	Detektion von spezifischen Transkriptionsfaktoren .
Au	[314]	DNA gesteuerte Kristallisation kolloidaler Nanopartikel
Au	[315]	Erzeugung thermisch stabiler Strukturen durch enzymatisch gesteuerte Anordnung von DNA-Goldnanopartikeln.
Au	[316]	DNA Nachweis; Dimere Nanopartikel.
Au	[317]	Nachweis von Adenosin induzierten Duplex-Strukturen in Aptameren.
Au	[318, 319]	Aufbau definierter, übereinander liegender Schichten von DNA-Nanopartikeln auf fester Phase.
Au	[320]	Nachweis von Kokain und Adenosin über Aptamere. Erst durch die Zugabe des Analyten wird ein Partikel-DNA-Netzwerk geöffnet.
Lipid	[321]	Nanopartikel Aggregation über <i>Molecular Beacons</i> zur SNP-Detektion mit bemerkenswerter SNP Empfindlichkeit.
CdSe / ZnS	[322]	DNA vermitteltes binäres Netzwerk aus Quantenpunkten.
SiO ₂ / Au	[323]	Anbindung von Au-Partikeln um große SiO ₂ Partikel herum.
UCNP / FeO	[324]	Kombination aus DNA funktionalisierten UCNPs und DNA funktionalisierten magn. Nanopartikeln zur DNA-Detektion.

Der Blick in die Literatur zeigt, dass sich die bisherigen Arbeiten hauptsächlich auf Gold-Nanopartikel beschränken. Der Grund ist, dass diese am besten erforscht wurden, sehr spezielle optische Eigenschaften besitzen, besonders klein (bis zu 5 nm) und leicht herzustellen sind.^[136, 325] In Deutschland beschäftigt sich besonders *Christof Niemeyer* mit DNA funktionalisierten Gold-Nanopartikeln.^[319, 326-329]

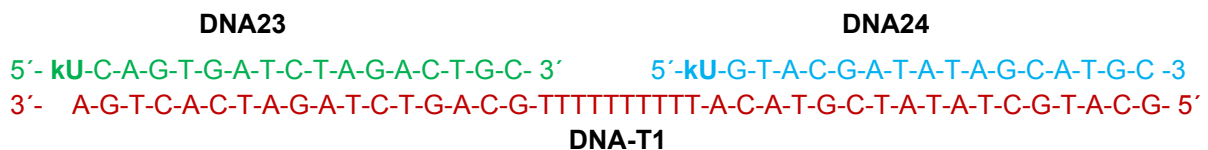
Im Folgenden wird untersucht, ob DNA-funktionalisierte Upconversion-Nanopartikel, durch Ziel DNA zu einem Netzwerk verbunden werden können. Dazu

wurden Upconversion Nanopartikel mit Oligomeren unterschiedlicher Sequenzen hergestellt. In einem ersten Versuch wurden drei Proben angesetzt:

A) Die erste Probe enthielt zwei Sorten DNA modifizierter Upconversion-Nanopartikel, bei denen die Sequenzen zueinander komplementär sind.



B) Die zweite Probe enthielt zwei Sorten DNA modifizierter Upconversion-Nanopartikel, die nicht komplementärer zueinander sind. Zu dieser Probe wurde eine Ziel-DNA zugegeben, deren Sequenz jeweils zu den beiden DNA-funktionalisierten Nanopartikeln komplementär ist. Die Sequenz wird über einen Poly-T-Spacer in der Mitte flexibel gehalten:



C) Die dritte Probe enthielt nur die gleichen Nanopartikel mit einer DNA-Sequenz die nicht komplementär (hier selbstkomplementär) ist.



Alle drei Proben wurden kurz bei 90 °C hybridisiert, um zu gewährleisten, dass alle DNA Wechselwirkungen aufgehoben sind und sich die DNA mit den Partikeln neu selbstorganisieren kann.

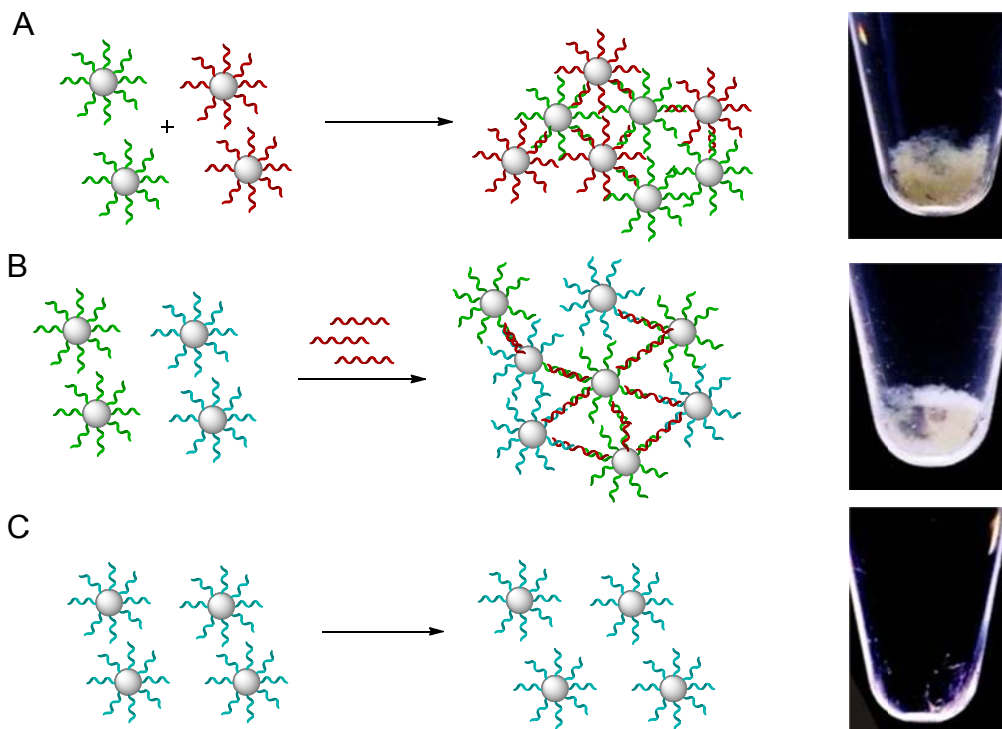


Abb. 88: Selbstorganisation von DNA-funktionalisierten Upconversion Nanopartikeln. **A)** Zwei Sorten DNA funktionalisierter Nanopartikel, deren Sequenz zueinander komplementär ist: **DNA25** und **DNA26**. **B)** Zwei Sorten DNA funktionalisierter Nanopartikel, die nicht komplementär zueinander sind **DNA23** und **DNA24**. Zugabe eines zu beiden Sequenzen komplementären Ziel-Stranges **DNA-T1**. **C)** Nur eine Sorte DNA funktionalisierter Nanopartikel, die nicht komplementär sind: **DNA24** (alle Versuche in 10 mM NaP_i, pH 7, mit NaCl c = 250 mM; ca. 1 mg NP).

In den Proben A und B bildeten sich innerhalb kurzer Zeit makroskopische Flocken, die mit der Zeit sedimentieren. In Probe C war nichts zu beobachten, selbst nach mehreren Tagen bildete sich kein Niederschlag. Die Niederschläge in A und B beruhen auf der Ausbildung von makroskopischen Aggregaten, die nicht mehr löslich sind. Derartige Beobachtungen werden bei vergleichbaren Versuchen mit anderen Nanopartikeln auch von *Mirkin et al.* beschrieben.^[309] *Zheng et al.* erhielten einen nahezu identischen flockigen Niederschlag nach der Zugabe von Ziel-DNA zu Nanopartikeln die mit *Molecular Beacons* modifiziert waren.^[321] Erwähnenswert ist auch, dass Versuche, die ohne Salz und ohne Phosphatpuffer durchgeführt wurden in keinem Fall Flocken oder Niederschläge zeigten.

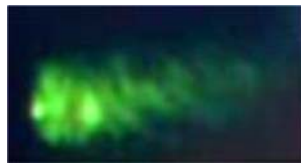


Abb. 89: Foto des flockigen Niederschlages der Probe A bei Anregung mit einem IR-Laser ($\lambda_{\text{exc}} = 980 \text{ nm}$).

Für einen weiteren Schritt wurde das Experiment wiederholt und dabei das Probengefäß mit einem IR-Laser ($\lambda = 980 \text{ nm}$) bestrahlt. Da Licht dieser Wellenlänge für das menschliche Auge nicht sichtbar ist, können nur die dadurch angeregten UCNPs sichtbar emittieren. Nach Zugabe einer Ziel-DNA zur Nanopartikel-Lösung sollten sich die Partikel wieder vernetzen und sedimentieren, wodurch die überstehende Lösung ihre Fluoreszenz verliert. Genau das ist auch zu beobachten (s. **Abb. 90**).

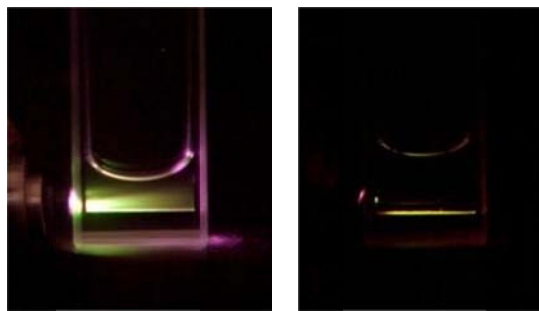


Abb. 90: Links: DNA funktionalisierte Nanopartikel nach Zugabe von Ziel-DNA (Probe B). Rechts: Dieselbe Küvette nach 2 Stunden, die Lösung zeigt keine Fluoreszenz mehr. Nur die sedimentierten Aggregate fluoreszieren am Boden. Der Laser ($\lambda_{\text{exc}} = 980 \text{ nm}$) durchstrahlt die Probe jeweils waagrecht von links nach rechts.

Es wurde auch versucht, die so entstandenen Aggregate durch Elektronenmikroskopie zu visualisieren (s. Abb. 91). Dazu wurden Proben aus zwei unterschiedlichen Ansätzen untersucht. Die TEM-Bilder **a** und **b** sind der Probe A (s. oben) entnommen, der Probe mit zueinander komplementärer DNA. Die Bilder zeigen zwar eine dreidimensionale Struktur aggregierter Nanopartikel, es ist jedoch keinerlei Systematik zu erkennen. Das TEM Bild **b** zeigt aber eine äußerst dicht gepackte Anordnung der Nanopartikel. Dies könnte ein Hinweis auf eine DNA-verknüpfte Struktur sein. Ein oft beobachtetes Merkmal von DNA vermittelten Partikelanordnungen ist deren diskreter Abstand zueinander. Dieser Abstand wird durch die Länge der verbrückenden DNA determiniert. Die TEM Bilder **a** und **b** lassen jedoch keine eindeutigen Aussagen zu.

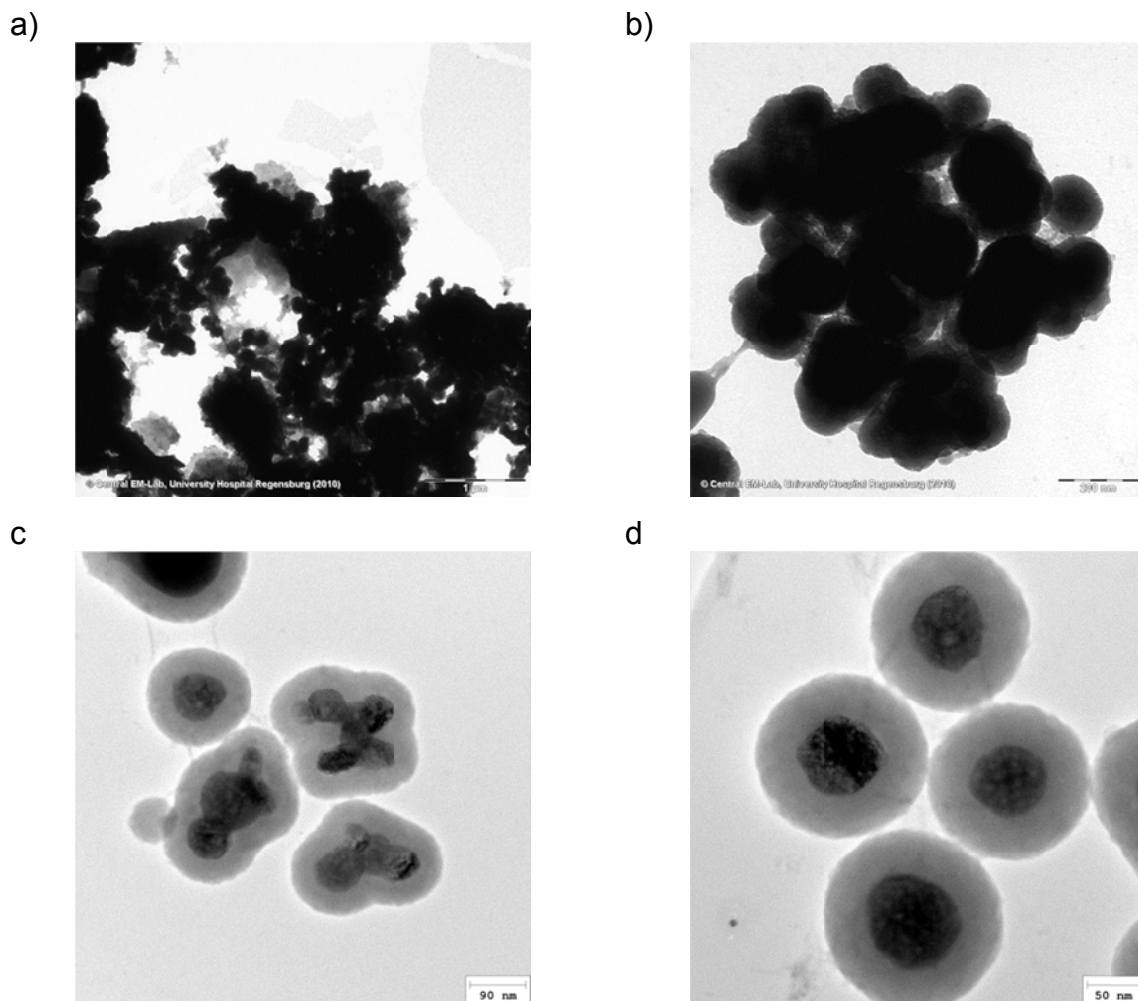


Abb. 91: a) und b): TEM-Bilder der Probe A (s. Abb. 88). c) und d): TEM-Bilder aus der Reproduktion des Versuchs. Gleicher Versuch, gleiche DNA-Sequenz aber andere Chargen an DNA und UCNPs.

Anders die Aufnahmen **c** und **d** in **Abb. 91**. Hier ist jeweils ein Cluster aus je vier Upconversion-Nanopartikeln zu erkennen. Bei genauer Betrachtung fällt der diskrete Abstand zwischen den Partikeln auf. Unmodifizierte Nanopartikel zeigen diese exakten Abstände nicht, sie agglomerieren ohne Abstand oder liegen übereinander (vgl. **Abb. 82** und **Abb. 98**). Diese DNA bedingten charakteristischen Abstände sind in der Literatur gut beschrieben^[323, 330] und waren bereits in der eingangs erwähnten Pionierarbeit von *Chad Mirkin et al.* zu beobachten^[309] (s. **Abb. 92**).

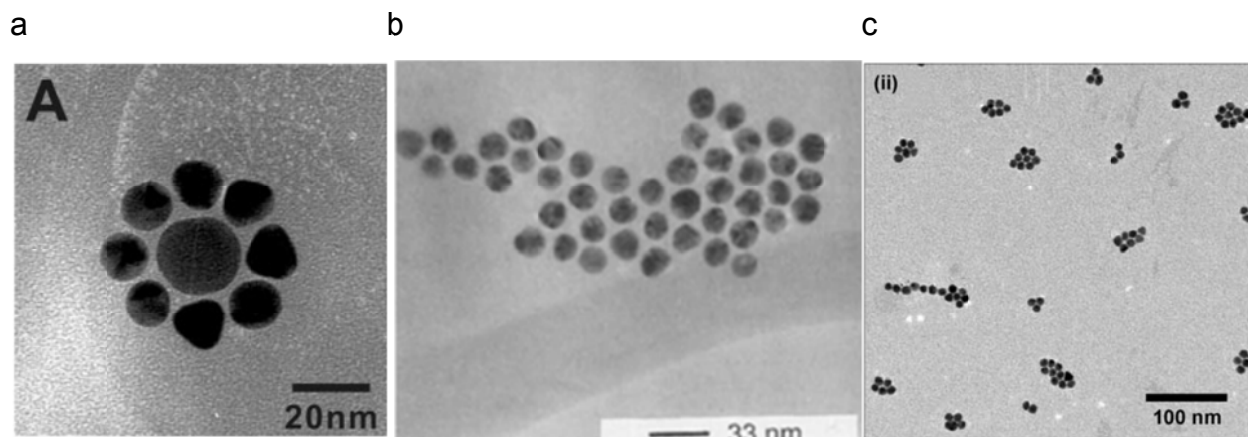


Abb. 92: Literaturbeispiele für DNA gesteuerte Nanopartikel Anordnung. **a)** Satellitenstruktur aus DNA funktionalisierten Gold-Nanopartikeln die um einen größeren angeordnet sind. **b)** In diesem Beispiel entsprechen die Abstände der Nanopartikel zueinander mit 6 nm exakt der Länge des DNA-Linkers. **c)** Weiteres Beispiel für DNA vermittelte Nanopartikelverbände mit diskreten Abständen. (Wiedergabe mit Genehmigung: **a)** aus Lit.^[323] Copyright Wiley-VCH 2006; **b)** aus Lit.^[309] Copyright Nature 1996; **c)** aus Lit.^[330] Copyright Wiley-VCH 2006).

Diskussion:

Leider konnten nie größere Netzwerke im Elektronenmikroskop beobachtet werden. Möglicherweise spielt die Probenpräparation für das TEM im Hochvakuum eine Rolle. Ein anderer Grund mag in der Partikelgröße liegen. In der Literatur werden größere Cluster und sogar Netzwerke beschrieben, die mit sehr kleinen Gold-Partikeln entstanden. Die hier verwendeten UCNPs sind mit 60- 80 nm aber ungefähr zehnmal so groß. Scheinbar spielt das Verhältnis von Partikelgröße zu DNA-Länge für die Ausmaße der Vernetzung eine wichtige Rolle. Bei sehr kleinen Partikeln ist mit Oligomeren bis 20 Basen eine effektive Vernetzung möglich. Bei größeren Partikeln ist mit Oligomeren der gleichen Länge scheinbar nur eine Vernetzung weniger Partikel möglich bzw. ein ungerichtetes makroskopisches Agglomerat. Der wichtigste Einfluss scheint jedoch die Partikelgröße zu sein. Diese Hypothese und die Beobachtungen im Elektronenmikroskop decken sich mit Untersuchungen von *Gang et al.*, die 2007 die DNA-regulierte Anordnung von Mikro- mit Nanopartikeln verglichen.^[330] Festzuhalten bleibt, dass es möglich ist, mit DNA-funktionalisierten Nanopartikeln organisierte Vernetzungen zu erreichen. Besonders beeindruckend ist dabei die Ausbildung von makroskopischen Niederschlägen bei Zugabe von Ziel-DNA.

8.2 Zelluläre Bildgebung

Die überragende Eigenschaft von Upconversion-Nanopartikeln ist deren Fluoreszenz im sichtbaren Wellenlängenbereich bei gleichzeitiger Anregung mit IR-Licht.^[143] Dabei bleichen sie weder aus noch zeigen sie periodisches Blinken wie z.B. Quantenpunkte.^[331] Diese Eigenschaften machen Upconversion-Nanopartikel zu einem der vielversprechendsten Materialien für bioanalytische Anwendungen in Zellen.^[149, 150]

Es ist bekannt, dass bestimmte Nanopartikel ohne künstliche Transfektionshilfen durch unterschiedliche Endozytose-Prozesse die Zellmembran überwinden können.^[180] Für die hier entwickelten DNA funktionalisierten Upconversion-Nanopartikel galt es nun grundsätzlich zu überprüfen, ob auch diese in der Lage sind, in den Intrazellulärraum aufgenommen zu werden und dort Fluoreszenzsignale liefern. Das ist aus vielerlei Hinsicht von Bedeutung. Zum einen ist es damit möglich, fluoreszierende Nanopartikel ohne Transfektionshilfen wie Elektroporation oder Mikroinjektion in Zellen zu schleusen, was für *in vivo* Anwendungen wichtig ist. Zum anderen ermöglicht die DNA zusätzliche Funktionen wie DNA/RNA-Detektion, Antisense-DNA oder Einbringen einer fluoreszierenden DNA-Sonde.^[137]

Die zelluläre Aufnahme von Partikeln ist abhängig von deren Größe und Oberflächenbeschaffenheit.^[299] Das Polyanion DNA unterscheidet sich dadurch deutlich von unmodifizierten UCNPs. In Kooperation mit der Forschungsgruppe um Prof. Wegener vom Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik der Universität Regensburg wurden diese Eigenschaften an NRK-Zellen („*normal rat kidney*“, Nierenzellen der Ratte) untersucht. Dafür wurden sowohl unmodifizierte als auch DNA-funktionalisierte UCNPs mit unterschiedlichem Partikelgehalt (100 µg, 250 µg, 500 µg) auf eine Zellkultur gegeben und für 24 h inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurden die Zellen fixiert und im Lichtmikroskop untersucht (s. **Abb. 93**). Dazu war ein leistungsfähiges konfokales Fluoreszenzmikroskop mit IR-Quelle notwendig. Ein solches steht am DFG-Forschungszentrum für Experimentelle Biomedizin in Würzburg zur Verfügung.

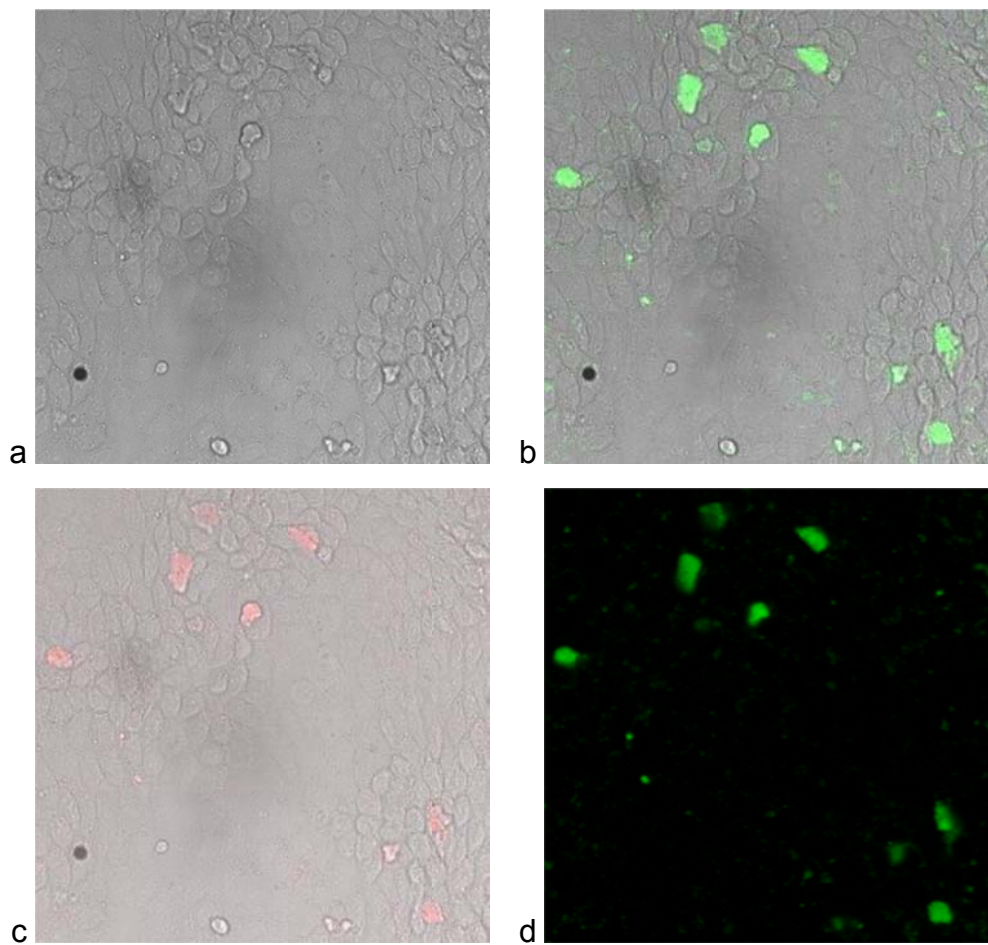


Abb. 93: LSM Aufnahmen von NRK-Zellen mit $\sim 250 \mu\text{g}$ unmodifizierten Azido-UCNPs. **a)** Hellfeld, **b)** Überlagerung Hellfeld- und Fluoreszenzaufnahme grüner Kanal und **c)** roter Kanal, **d)** Dunkelfeld Fluoreszenzaufnahme grüner Kanal. Anregung aller Fluoreszenzbilder bei $\lambda = 980 \text{ nm}$ ($P_o = 50 \text{ mW}$).

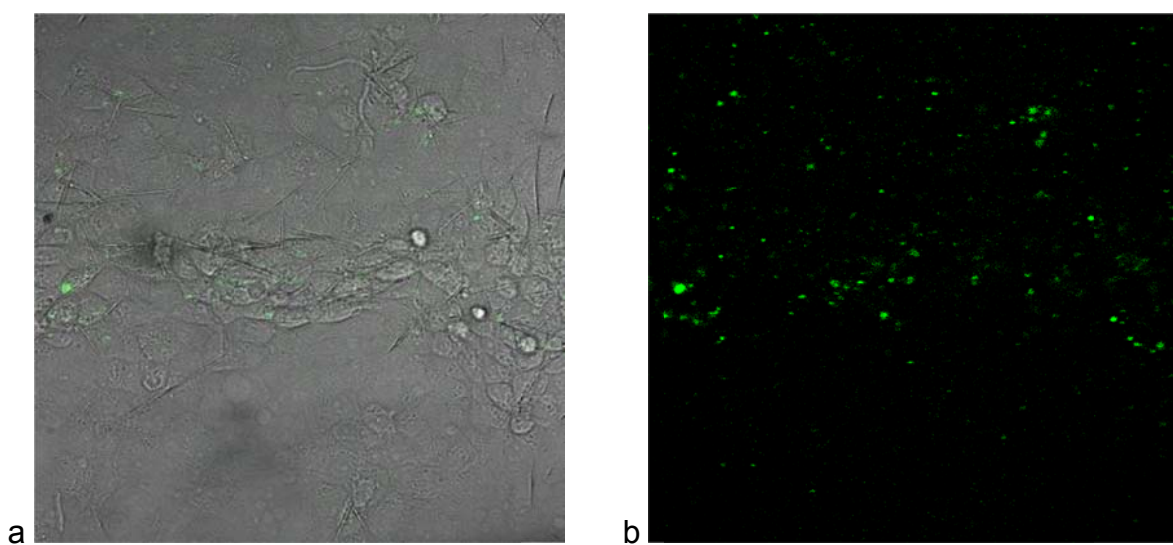


Abb. 94: LSM-Aufnahmen von NRK-Zellen mit $\sim 500 \mu\text{g}$ DNA funktionalisierten UCNPs unter Anregung bei $\lambda = 980 \text{ nm}$ ($P_o = 50 \text{ mW}$), jeweils grüner Kanal. **a)** Überlagerung aus Hellfeld- und Fluoreszenzaufnahme, **b)** Dunkelfeld Fluoreszenzaufnahme.

Die Bilder zeigen zunächst, dass in allen Fällen Partikel in die Zellen aufgenommen wurden und im Intrazellulärraum zum Teil kräftig fluoreszieren (grün oder rot je nach Kanal). Allein diese Beobachtung zeigt sehr deutlich, dass alle verwendeten Partikel mit den Methoden der Zellbiologie und der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie kompatibel sind. Bei Betrachtung der einzelnen Bilder werden jedoch große Unterschiede sichtbar: In **Abb. 93** ist deutlich eine intensive Fluoreszenz in einzelnen Zellen zu erkennen. Scheinbar wurden hier besonders viele Nanopartikel aufgenommen. In **Abb. 94** sind deutlich schwächere Fluoreszenzsignale zu erkennen. Hier wurden die Zellen mit ~500 µg DNA-modifizierten UCNPs inkubiert (doppelt so viel als bei den nicht DNA-modifizierten). Scheinbar werden von den Zellen weniger DNA-modifizierte Partikel aufgenommen als unmodifizierte.

Der Hauptgrund für dieses Verhalten liegt wahrscheinlich in der unterschiedlichen Oberflächenladung. Nanopartikel mit negativ geladener Oberfläche werden anders aufgenommen als neutral oder positiv geladene Nanopartikel.^[332-334] Es ist hinreichend bekannt, dass Nanopartikel mit positiver Oberflächenladung deutlich besser in Zellen aufgenommen werden als solche mit negativer Ladung.^[180, 299] Der Grund hierfür liegt in den repulsiven Wechselwirkungen der negativ geladenen Zelloberfläche und den negativ geladenen Partikeln. Die azidmodifizierten Upconversion-Nanopartikel sind formal durch Mesomerie positiv und negativ geladen. Ein DNA Strang der verwendeten Oligomere alleine trägt aber bereits 17 negative Ladungen im Phosphatrückgrat und unterscheidet sich somit deutlich von den UCNPs ohne DNA. Trotzdem hat sich gezeigt, dass DNA-modifizierte UCNPs in Zellen aufgenommen werden können und dort ein Fluoreszenzsignal liefern. Weshalb aber einzelne Zellen besonders sehr stark fluoreszieren und offensichtlich besonders viele UCNPs aufgenommen haben ist unklar, es scheint jedoch schädlich zu sein. Da die Aufnahme von Nanopartikeln stark vom jeweiligen Zelltyp abhängt, lässt sich das Ergebnis nicht uneingeschränkt auf andere Zellsysteme übertragen. Für zukünftige Anwendungen wäre zu überlegen, die Zellaufnahme durch Transfektionshilfen wie polykationische Lipide (z.B. Lipofectamine™) zu verbessern.

8.3 Untersuchungen zur Cytotoxizität

Über die Cytotoxizität von Upconversion Nanopartikeln des Typs NaYF₄:Yb/Er ist bereits einiges bekannt.^[147] Bei einer Reihe von Anwendungen sowohl in vivo als auch in vitro zeigten Upconversion-Nanopartikel nur eine geringe bis gar keine Toxizität.^[158, 335-339] In einer Arbeit von *Jalil* und *Zhang* konnten bei einer intravenösen Injektion von silicamodifizierten Upconversion-Nanopartikel bei Ratten (Dosierung: 10 mg/kg KG) keine gesundheitlichen Schäden beobachtet werden.^[340] Aus anderen Untersuchungen geht hervor, dass eine Konzentration von Upconversion-Nanopartikeln von 500 µg/mL als unkritisch einzustufen ist.^[335] Ein Grund mag die geringe Eigentoxizität von Metallen der seltenen Erden wie Yttrium, Ytterbium oder Erbium sein. Im Vergleich zu Selenverbindungen in Quantenpunkten ist die mittlere letale Dosis für Oxide der seltenen Erden mit 1 mg/kg KG ungefähr 1000 mal geringer.^[158] Die deutlich geringere Toxizität von Metallen aus Upconversion-Nanopartikel-Verbindungen verglichen mit Quantenpunkten konnte in einer vergleichenden Studie von *Tan et al.* bestätigt werden.^[341]

Die Cytotoxizität von Nanomaterialien ist von mehreren Faktoren abhängig. Hauptsächlich aber von Größe, Zusammensetzung und Oberflächenbeschaffenheit (vgl. Kapitel 3.4.4).^[179, 342] Für DNA-modifizierte Upconversion-Nanopartikel gibt es keine Untersuchungen zu deren Cytotoxizität. Da DNA-funktionalisierte UCNPs potentiell für in vivo- und in vitro-Anwendungen in Frage kommen, ist es wichtig, deren toxikologisches Potential einzuschätzen. Aus diesem Grund wurde zusammen mit der Arbeitsgruppe von *Prof. Wegener*, die besondere Erfahrung auf dem Gebiet von Cytotoxizitäts-Untersuchungen mit Nanomaterialien hat, eine vergleichende Untersuchung von silicamodifizierten Upconversion-Nanopartikeln mit DNA-funktionalisierten Upconversion-Nanopartikeln durchgeführt. Als Methode wurde ein *Alamar Blue Assay* angewandt. Bei dieser Methode wird die Vitalität der Zellen über eine NADH-abhängige Farbreaktion bestimmt. Der blaue Phenoxazin Farbstoff Resazurin wird von gesunden Zellen unter Verbrauch von NADH zum rötlichen Resorufin reduziert. Bei cytotoxischen Vorgängen ist dieser Vorgang gestört und es findet keine Farbstoffreaktion mehr statt. Die betreffenden Proben erscheinen blau. Als Zelltyp wurden, wie bei den Versuchen zur zellulären Bildgebung, NRK-Zellen verwendet.

Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an unmodifizierten Nanopartikeln mit Silica-Hülle und mit DNA-funktionalisierten Upconversion-Nanopartikeln inkubiert. Die Stammlösungen der beiden Proben wurden für 10 min im Ultraschallbad behandelt und anschließend 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000 (0,1 mg/mL – 0,01 µg/mL) verdünnt und auf die jeweiligen Zellen gegeben.

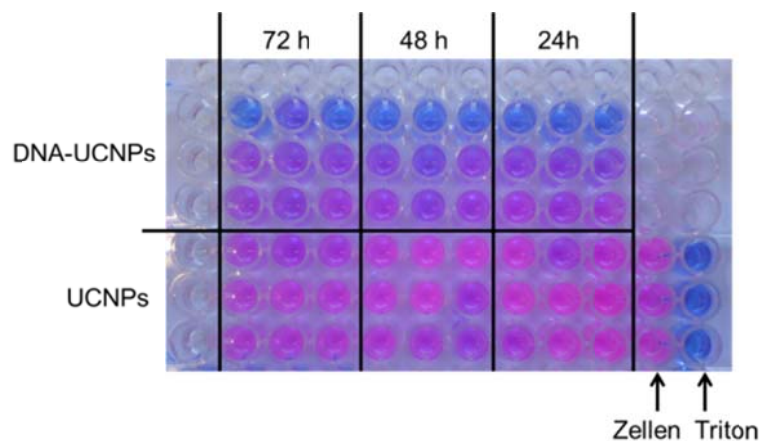


Abb. 95: Alamar Blue Assay von unmodifizierten UCNPs und DNA-modifizierten UCNPs. Durch eine Farbstoffreaktion von Resazurin mit NADH färben sich gesunde Zellen rötlich. Bei gestörtem Zellstoffwechsel bzw. Zelltod erscheinen die Proben blau.

Die Auswertung des Assays zeigt deutlich blau gefärbte Probenkammern bei den DNA modifizierten Upconversion-Nanopartikeln (**Abb. 95**). Bei den unmodifizierten Nanopartikeln ist nur eine leichte Veränderung zu erkennen. Die Cytotoxizität steigt nie über 20 %, wobei bei den DNA-funktionalisierten UCNPs bei einer Konzentration von ~0,1 µg/mL nahezu 100 % Toxizität nachzuweisen ist. Aber auch bei der niedrigsten Konzentration ist noch eine höhere Toxizität festzustellen als bei den unmodifizierten. Die Zeit scheint nur bei den höchsten Konzentrationen der unmodifizierten UCNPs eine Rolle zu spielen. Hier ist nach 72 h die höchste Toxizität mit ungefähr 20 % festzustellen.

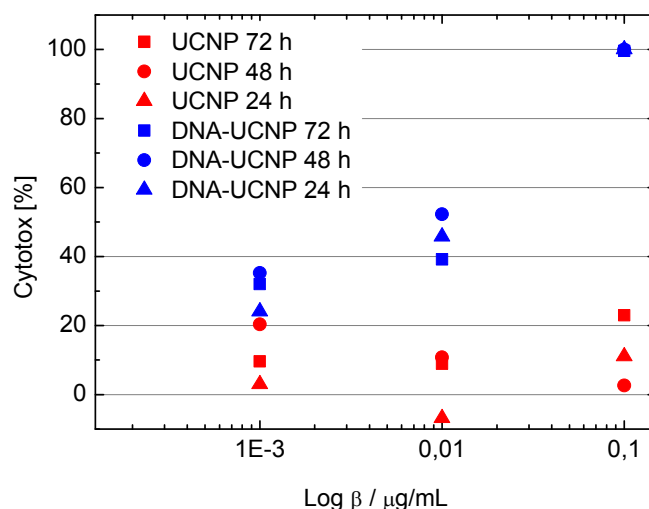


Abb. 96: Quantitative Auswertung des Alamar Blue Assays.

Dieses Ergebnis ist zunächst verwunderlich. Es wäre plausibel, wenn die DNA als biologisches Material von Zellen besser akzeptiert würde als anorganisches Fremdmaterial. Dies ist aber hier nicht der Fall. Auch eine Wiederholung des Versuches lieferte ähnliche Ergebnisse. Bei genauerer Betrachtung rücken Kupferionen aus der Synthese in den Focus. Für die 1,3-dpolare Cycloaddition der DNA an die Nanopartikel wird ein Cu(I)-Komplex zur Katalyse verwendet. Die anschließende Größenausschlusschromatographie dient zwar der Entsalzung der Proben, dabei ist jedoch nicht auszuschließen dass Kupferionen verschleppt werden. Es ist auch vorstellbar, dass sich Kupferionen zwischen den eng gepackten DNA-Strängen befinden, die erst durch DNA-Abbau in der Zelle freigesetzt werden. Kupferionen sind stark cytotoxisch. In einer Reihe von Versuchen konnte gezeigt werden, dass Nanopartikel, die im Zellinneren Kupferionen abgeben, eine stark erhöhte Toxizität aufweisen.^[343-345] Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden die Proben mit Kupfer komplexierender Festphasen-EDTA behandelt und erneut untersucht. Zusätzlich wurde eine Lösung des Kupfer-Komplexes der für die Klick-Reaktion verwendet wird untersucht. Die übliche Konzentration bei der Klick-Reaktion liegt bei ungefähr 1,7 mM. Durch die Chromatographie wird aber weiter verdünnt, weshalb für den Assay mit einer maximalen Konzentration von 10 nM begonnen wird.

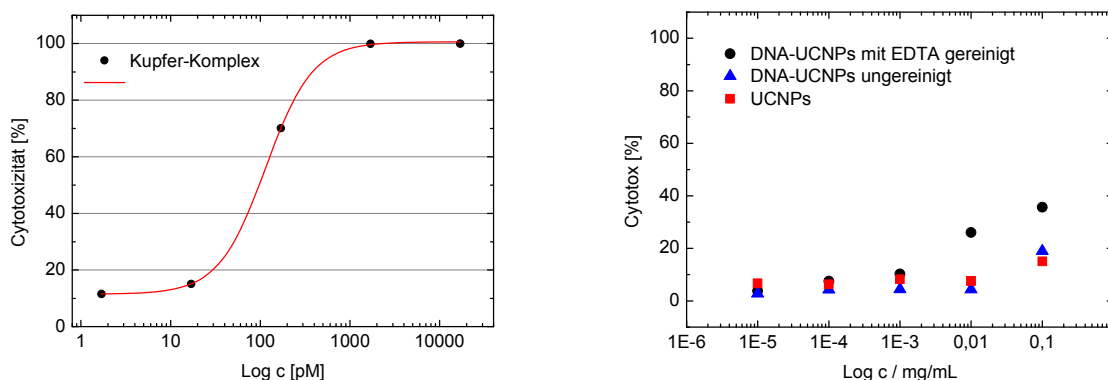


Abb. 97: Auswertung des dritten Alamar Blue Assays. Links: Konzentrationsabhängige Cytotoxizität des Kupfer-Komplexes. Rechts: Vergleich der Cytotoxizität von reinen UCNPs, DNA-UCNPs und mit EDTA behandelten DNA-UCNPs bei unterschiedlichen Konzentrationen.

Die Auswertung des Assays zeigt zunächst deutlich, dass eine konzentrationsabhängige Toxizität für den Kupfer-Komplex zu beobachten ist. Bei einer 1 nM und einer 10 nM Lösung sterben alle Zellen. Erst bei einer Konzentration von 10 pM sinkt die Cytotoxizität auf unter 20 %. Zwischen EDTA-behandelter Probe und nicht behandelter Probe ist kein Unterschied zu sehen. Offensichtlich ist es nicht möglich Kupferionen nachträglich durch EDTA zu entfernen. Allgemein fällt bei diesem Versuch auf, dass die Cytotoxizität der DNA-funktionalisierten Upconversion-Nanopartikel nicht mehr so hoch ist wie beim ersten Versuch. Da zwischen beiden Assays mehrere Wochen lagen, ist nicht auszuschließen, dass sich die Proben verändert haben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die in dieser Arbeit verwendeten DNA-funktionalisierte Upconversion-Nanopartikel toxischer sind als die unmodifizierten. Als Hauptgrund werden aus der Synthese verschleppte Kupferionen dafür verantwortlich gemacht. Das Kontrollexperiment mit dem verwendeten Kupfer-Komplex zeigt eine konzentrationsabhängige Cytotoxizität, bei der deutlich wird, dass schon geringste Mengen des Kupfer-Komplexes toxisch wirken. Des Weiteren unterscheiden sich die Ergebnisse für DNA-modifizierte Upconversion-Nanopartikel. Da zwischen den einzelnen Assays größerer Zeiträume liegen, mag dies auf Alterungsprozesse zurückzuführen sein. Offensichtlich sind die Kupferionen der limitierende Faktor für diese Art von DNA-verknüpften Nanopartikeln. Eine in vitro und in vivo Anwendung ist nach diesen Ergebnissen nicht möglich. Als Alternative müsste eine kupferfreie Klick Konjugation z. B. über Cyclooctine gewählt werden.

9 Zusammenfassung

9.1 Funktionelle DNA-Sonden mit CylQ

Der Hauptteil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung des klickbaren Cyaninfarbstoffs CylQ (*Cyanine Indole Quinoline*), dem Aufbau funktioneller DNA-Sonden und dem bioanalytischen Einsatz dieser Sonden. Zunächst wurde eine Synthesestrategie entwickelt mit der CylQ postsynthetisch an jede beliebige Stelle der DNA verknüpft werden kann. Dazu wurde der Farbstoff mit einem kurzen Propylazid-Linker versehen, über den durch eine kupferkatalysierte Huisgen-Cycloaddition der Chromophor an ein alkinmodifiziertes Uridin verknüpft werden kann. Die Klick-Konjugation von CylQ verläuft dabei mit Ausbeuten über 70 % und der Farbstoff bleibt stabil. Im Vergleich zu einem Einbau während der DNA-Festphasensynthese wird dabei nur ein Zehntel an Farbstoffsubstanz benötigt.

Kovalent in DNA gebunden zeigt CylQ eine breite Absorptionsbande zwischen $\lambda = 400$ nm und 550 nm mit einem Maximum bei 495 nm. Der Extinktionskoeffizient bewegt sich dabei typischerweise bei $\epsilon_{495} = 60.000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Angeregt bei $\lambda_{\text{exc}} = 495$ nm fluoresziert CylQ typischerweise im Bereich von $\lambda = 500 - 700$ nm mit einem Maximum bei $\lambda = (560 \pm 10)$ nm. Die Emission erfolgt also mit einer Stokes-Verschiebung von ca. $\lambda = 75$ nm. Die Fluoreszenzquantenausbeuten bewegen sich bei Einfacheinbauten um 8 % ($\Phi_{\text{dsDNA1}} = 0,08$). Mit einer durchschnittlichen Helligkeit von 5600 erreicht CylQ ein Drittel der Helligkeit von Cy3 in vergleichbaren DNA-Strängen. Nach Untersuchung der Redoxeigenschaften hat sich gezeigt, dass CylQ in der Lage ist Guanin zu oxidieren.

Ein wichtiges Kriterium in bioanalytischen Anwendungen ist die Photostabilität eines Chromophors. Daher wurde CylQ mit Cy3, Thiazolrot, Thiazolorange, BODIPY und Fluorescein in DNA verglichen. Nach 30-minütiger Bestrahlung sind von CylQ und Cy3 immer noch über 90 % der ursprünglichen Fluoreszenz vorhanden wobei die anderen Farbstoffe bereits zur Hälfte oder ganz ausgebleichen sind.

Im Anschluss wurden eine ganze Reihe unterschiedlicher DNA-Sonden mit Farbstoff-Dimeren synthetisiert und deren photophysikalische Wechselwirkungen untersucht. Darunter auch FRET-Sonden aus CylQ und Thiazolrot, da sich CylQ

durch seine relativ große Stokes Verschiebung gut als FRET-Donor eignet. Der beste Erfolg konnte jedoch mit einem CylQ-Dimer in einer Intrastrang Anordnung erzielt werden. Dabei ist die Fluoreszenz der Sonde im Einzelstrang stark gelöscht. Erst durch Hybridisierung mit dem korrekten Gegenstrang zeigt die Sonde intensive Fluoreszenz. Mit dieser Sonde war es möglich Basenfehlpaarungen in DNA über den Bereich eines ganzen Codons zu detektieren, was CylQ für die Erkennung von Einzelbasenpolymorphismen (SNPs) interessant macht.

Abschließend wurde eine CylQ-DNA-Sonde erstmals in einem korrelativen Ansatz aus Licht- und Elektronenmikroskopie im Bereich der analytischen Zellbiologie eingesetzt. Dabei gelang es in Echtzeit am Fluoreszenzmikroskop den Weg der DNA, eingehüllt in Lipoplexe, in Zellen zu verfolgen. Da CylQ durch eine photoinduzierte Reaktion mit Diaminobenzidin eine lokale Polymerisation initiiert, war es anschließend möglich unter dem Elektronenmikroskop in Zellschnitten die exakte Position der Sonde auf ihrem Weg vom Extrazellulärraum bis hin zum Zellkern zu verfolgen. Die Sonde wird derzeit am Tiermodell validiert.

Fazit: Es konnte gezeigt werden, dass CylQ schnell, postsynthetisch und mit geringem Einsatz von Substanz an beliebige Stellen von Oligomeren geklickt werden kann. Dabei zeigt CylQ interessante photophysikalische Eigenschaften. Die Kombination aus hoher Photostabilität und großer Stokes Verschiebung macht CylQ zu einer interessanten Alternative zu Fluorescein, FAMTM, Atto[®] 495 bzw. 520, Alexa Fluor 500[®] und Thiazolorange. Aus ersten bioanalytischen Versuchen geht hervor, dass sich CylQ-DNA-Sonden gut für fluoreszenzmikroskopische oder korrelative Anwendungen aus Licht- und Elektronenmikroskopie eignen. Auch ein Einsatz in der DNA-Analytik ist denkbar. Die Verknüpfung über ein Uridin schafft zusätzlich die Möglichkeit der Übertragung auf RNA, was das Anwendungsspektrum des Fluorophors zusätzlich erweitert.

9.2 DNA-modifizierte Upconversion-Nanopartikel

Im zweiten Teil dieser Arbeit wird eine Methode zur Funktionalisierung von Upconversion Nanopartikeln mit DNA entwickelt, die ebenfalls auf der kupferkatalysierten 1,3-Dipolaren Cycloaddition zwischen Alkinen mit Aziden beruht. Dafür wurden Oligomere am 3'- oder 5'-Ende mit einem 2'-O-Propargyluridin synthetisiert und an die azidmodifizierte Oberfläche von Upconversion Nanopartikeln verknüpft. Die erfolgreiche Konjugation konnte durch IR-Spektroskopie, Hybridisierungsversuche und Anfärbung mit Ethidiumbromid nachgewiesen werden. Die Aufreinigung der Nanopartikel-Konjugate und die Abtrennung überschüssiger Oligomere erfolgt durch eine Temperaturoptimierte Gelpermeationschromatographie (GPC). Die herausragende Eigenschaft von Upconversion Materialien ist deren Emission im Sichtbaren, bei Anregung im Infraroten Spektralbereich. Diese Eigenschaft macht Upconversion-Nanopartikel interessant für bioanalytische Anwendungen was auch für die DNA-funktionalisierten Partikel überprüft wurde. Dabei konnte gezeigt werden dass sowohl unmodifizierte als auch DNA-modifizierte Upconversion-Nanopartikel in der Lage sind Zellmembranen zu überwinden und dabei deutliche Fluoreszenzsignale liefern. DNA verleiht den Nanopartikeln eine sequenzspezifische Erkennbarkeit. Diese Möglichkeit der molekularen Erkennung wurde durch DNA-gesteuerte Aggregation komplementärer Nanopartikel nachgewiesen. Besonders eindrucksvoll ist die Aggregation zu flockigen Niederschlägen bei Zugabe einer Ziel-DNA zu nicht komplementären Nanopartikeln. In Cytotoxizitäts-Assays stellte sich schließlich heraus, dass die in dieser Arbeit verwendeten DNA-modifizierten Upconversion-Nanopartikel toxischer sind als unmodifizierte. Als Hauptgrund werden verschleppte Kupferionen der Klick-Reaktion diskutiert. Dieses Ergebnis liefert wichtige Erkenntnisse für den stetig wachsenden Einsatz der Klick-Konjugation in bioanalytischen Systemen. Bei zukünftigen Anwendungen dieser Reaktion muss dieses Problem berücksichtigt werden und gegebenenfalls auf etablierte Methoden oder Kupfer freie Klick-Reaktionen, z. B. über Cyclooctine zurückgegriffen werden. Prinzipiell konnte jedoch gezeigt werden, dass Upconversion-Nanopartikel durch die Kombination mit DNA zusätzliche Funktionen erhalten und dadurch ihr Anwendungsspektrum erweitern können.

10 Materialien und Methoden

10.1 Materialien, Geräte und allgemeine Methoden

Reagenzien

Die bei der Synthese verwendeten Reagenzien und Chemikalien wurden von den Firmen *ABCR*, *Alpha Aesar*, *Fluka*, *Merck* und *Sigma Aldrich* bezogen. Die dabei verwendete Qualitätsstufe war mindestens „zur Synthese“.

DNA-Festphasensynthese

Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte an einem *Expedite 8909 Nucleic Acid Synthesizer* System von *Applied Biosystems*. Als feste Phase diente CPG (Controlled Pore Glass) mit einer Belegung von 1 μmol (500 Å). Phosphoramidite, Synthesizer Chemikalien und CPG-Säulen stammten von *ABI*, *Glen Research* und *Proligo*. Ab November 2011 wurde das 2'-O-Propargyl-Uridin als Phosphoramidit von *ChemGenes* bezogen.

Kommerzielle Oligonukleotide

Unmodifizierte Gegenstränge sowie die 5'-Cy3-markierte DNA wurden von *Metabion international* in HPLC gereinigtem Zustand bezogen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über UV/Vis-Absorption bei $\lambda = 260 \text{ nm}$.

Lösungsmittel

Technische Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert, trockene Lösungsmittel wurden von *Acros*, *Alfa Aesar*, *Fluka* und *Sigma Aldrich* bezogen und unter Argon- oder Stickstoff-Atmosphäre aufbewahrt. Für die HPLC wurden hochreine (HPLC Grade) organische Lösungsmittel (*LiChrosolv*, *Merck*, *Fluka*) sowie entionisiertes und ultrafiltriertes Wasser aus einer *Millipore*-Anlage verwendet.

Sublimationstrocknung

Wässrige Lösungen wurden an einer *Christ Alpha 1-2 LD Plus* Lyophilisierungsanlage nach ausfrieren in flüssigem Stickstoff getrocknet.

Reaktionsführung

Wenn nötig, wurden Reaktionen zum Luft- und Feuchtigkeitsausschluss unter Stickstoff- (Trocknung über BTS-Katalysator und Silicagel) oder Argon-Atmosphäre (Schweißargon 4.6, 99,996% rein) durchgeführt. Glasapparaturen wurden vorher im Hochvakuum ausgeheizt.

Dünnschichtchromatographie (DC)

Verwendet wurden fertige Aluminium DC-Platten der Firma *Merck* mit einer Beschichtung aus Kieselgel 60 F₂₅₄ und einer Schichtdicke von 0,25 mm. Die Auswertung erfolgte über die sichtbare Fluoreszenzlöschung bei $\lambda = 254$ nm bzw. über Fluoreszenz, angeregt bei $\lambda = 366$ nm. Als Anfärbe Reagenzien wurden entweder eine schwefelsaure Methanol Lösung (3 Vol.-% H₂SO₄) oder ein Ninhydrin-Sprüh-reagenz der Firma *Merck* (2 Vol.-% in DMSO) verwendet.

Flash-Säulenchromatographie (FC)

Als stationäre Phase wurde Kieselgel 60 der Firma *Merck* verwendet (Korngröße 40 – 63 μ m). Es wurde ausschließlich nass gepackt und nach dem Verfahren von *W. C. Still*^[346] bei ca. 0,4 bar Überdruck chromatographiert. Die zu reinigende Substanz wurde entweder im Laufmittel gelöst oder auf Kieselgel adsorbiert aufgetragen. Es wurden ausschließlich Glassäulen mit einer Fritte (Porengröße 3) verwendet.

Gelpermeationschromatographie (GPC) / Größenausschlusschromatographie (SEC)

- Für die Entsalzung nach Klickreaktionen wurden fertige *illustra NAP™-5*-Säulen (*Sephadex™ G-25 DNA Grade*) von *GE-Healthcare* verwendet. Es wurde mit 5 mM Ammoniumacetatpuffer äquilibriert und chromatographiert. Bei DNA liegt das Größenausschlusslimit von G-25 Gelen bei 10 Basen.
- Für die Trennung von freier DNA und Upconversion Nanopartikeln wurde ein *illustra™ Sephadex™ G-50 (Fine DNA Grade)* SEC-Gel von *GE-Healthcare*

verwendet. Es wurden jeweils 300 mg des Pulvers in leere und gereinigte *NAP-5*-Säulen (s.o.) eingewogen und mit 5 mM Ammoniumacetat-Puffer über eine Stunde bei 60 °C gequollen. Die Säulen wurden mit den vorher ausgebauten oberen Fritten wieder verschlossen, ohne jedoch das Gel zu komprimieren. Äquilibriert und Chromatographiert wurde ebenfalls mit 5 mM Ammoniumacetatpuffer (pH = 6,5). Das Größenausschlusslimit für G-50 Gele liegt bei 20 Basen oder 25 kDa. Bei größeren Mengen an zu trennender Substanz (> 1,5 mg NP bzw. 500 nmol DNA) müssen größerer (längere) Säulen verwendet werden.

Wichtig: Die Gele dürfen nie komprimiert werden, dies würde zum Verlust der Trenneigenschaften führen. Daher bei Aufsetzen der Filter behutsam vorgehen.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC):

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) von DNA wurde an einem modularen HPLC-System von *Shimadzu* durchgeführt (Autosampler SIL-10AD, Pumpenmodul LC-10AT, Steuereinheit SCL-10A, Multidiodenarray SPD-M10A, Fluoreszenzdetektor RF-10A XL). Detektion, Steuerung und Auswertung erfolgte mit der Software *Class VP*. Für die analytische Chromatographie wurde eine Reversed Phase *Supelcosil*TM LC-318-Säule (250 x 4,6 mm, 3 µm) verwendet. Semipräparative Trennungen erfolgten über eine Reversed Phase *Supelcosil*TM LC-318-Säule (250 x 10 mm, 5 µm). Die Flussrate bei analytischen Methoden betrug 1 mL/min und 2,5 mL/min bei semipräparativen Methoden. Die entsprechende Säule wurde mit 50 mM Ammoniumacetat-Puffer (pH = 6,5, Laufmittel A) äquilibriert und anschließend mit verschiedenen Acetonitril-Gradienten (Laufmittel B) eluiert. Die Detektion erfolgte über die DNA typische UV/Vis-Absorption bei $\lambda = 260$ und 290 nm. Bei DNA-Strängen mit eingebauten Farbstoffen wurde zusätzlich deren charakteristische UV/Vis-Absorption detektiert. Eine Übersicht über die verwendeten Methoden liefert Tabelle 17.

Tabelle 17: Übersicht der verwendeten HPLC-Methoden.

DNA/Modifikation	Gradient	Detektionswellenlängen
un- bzw. kU-modifiziert (bis 17 Basen)	0 – 15 % B, in 45 min, dann 5 min 15 % B isokrat.	260 nm, 290 nm
un- bzw. kU-modifiziert (> 17 Basen)	0 – 20 % B in 45 min, dann 5 min 20 % B isokrat.	260 nm, 290 nm
CylQ (Monomer)	0 – 20 % B in 45 min, dann 5 min 20 % B isokrat.	260 nm, 290 nm, 495 nm
CylQ (Dimer)	0 – 20 % B in 45 min, dann 5 min 20 % B isokrat.	260 nm, 290 nm, 495 nm
CylQ, TR (Dimer)	0 – 20 % B in 45 min, dann 5 min 20 % B isokrat.	260 nm, 290 nm, 495 nm, 630 nm

NMR

Kernresonanzspektren wurden an einem *Bruker Avance 300*, *Avance 400* oder *Avance 600-Kryo* durch die Abteilung für NMR-Spektroskopie der Zentralen Analytik an der Universität Regensburg gemessen. Die jeweiligen Analysen wurden in üblichen NMR-Probenröhrchen ($\varnothing = 5$ mm) gemessen. Es wurden typischerweise 10 mg Substanz in 0,7 mL deuteriertem Lösungsmittel gelöst. Chemische Verschiebungen δ werden in ppm angegeben und beziehen sich auf Trimethylsilan (TMS) als Nullpunkt. Für unvollständig deuterierte Lösungsmittel dienen folgende Referenzwerte^[347] bezüglich ihrer chemischen Verschiebung:

- CDCl_3 : $^1\text{H-NMR}$: $\delta = 7,26$ ppm $^{13}\text{C-NMR}$: $\delta = 77,16$ ppm
- CD_3CN : $^1\text{H-NMR}$: $\delta = 1,94$ ppm $^{13}\text{C-NMR}$: $\delta = 118,26$ ppm
- DMSO-d_6 : $^1\text{H-NMR}$: $\delta = 2,50$ ppm $^{13}\text{C-NMR}$: $\delta = 39,52$ ppm
- CD_3OD : $^1\text{H-NMR}$: $\delta = 3,31$ ppm $^{13}\text{C-NMR}$: $\delta = 49,00$ ppm

Kopplungskonstanten J werden in Hz angegeben. Die Multiplizität der ^1H -Signale wird wie folgt abgekürzt: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplett), q (Quartett), dd (Dublett von Dublett) und m (Multipllett).

Massenspektroskopie (MS)

ESI-, CI- und EI- Massenspektren wurden in der Betriebseinheit Zentrale Analytik, Abteilung Massenspektroskopie der Universität Regensburg gemessen. Die relevanten Spektrometer werden nachfolgend zusammengefasst.

- ESI-MS: ThermoQuest Finnigan TSQ 7000
- CI-MS: Finnigan MAT SSQ 710 A
- EI-MS: Finnigan MAT SSQ 710 A, Finnigan MAT 95

MALDI-TOF-Massenspektren wurden am Karlsruher Institut für Technologie an einem *BIFLEX-IV* Spektrometer von *Bruker Daltonics* im linearen negativen Modus gemessen. Als Matrix wurde eine Mischung von 2,4,6-Trihydroxyacetophenon (THAP, 0,3 M in Ethanol) und Diammoniumcitrat (0,1 M in Wasser) im Volumenverhältnis 2:1 verwendet. Die Angabe der Peaks erfolgt bei allen MS-Analysen in m/z mit Angabe der Intensität in % des Basispeaks.

Circulardichroismus

Die CD-Spektroskopie erfolgte an einem *Jasco J-715* Spektropolarimeter mit *PTC-150J* Thermostat. Die Spektren wurden gegen das Lösungsmittel basislinienkorrigiert. Es wurden folgende Geräteeinstellungen verwendet: Data pitch: 0,5 nm, Scanning Mode: continuous, Scanning Speed: 200 nm/min, Response: 0,5 s, Band Width: 1 nm, Accumulation: 5.

DR-FTIR-Spektroskopie

Diffuse-Reflexions-Infrarot-Fourier-Transformations-Spektroskopie (DRIFTS) wurde an einem *Jasco FT/IR-6100* Infrarotspektrometer mit *EasiDiff* Zusatzbauteil von *Pike Technologies* gemessen. Die Probe wurde hierfür lyophilisiert, verrieben und im pulverartigen Zustand vermessen.

Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Dynamische Lichtstreuung wurde in 5 mM Ammoniumacetatpuffer an einem *Zetasizer 300* von *Malmern Instruments* in monomodalem Modus bei $\lambda = 633$ nm gemessen. Die Viskosität wurde mit 0,89 (Wasser) angegeben.

Cyclovoltammetrie (CV)

Die CV-Messung mit CylQ erfolgte in einer „Drei-Elektroden-Anordnung“ (Arbeits-, Referenz-, und Gegenelektrode aus Platin). Die Messung erfolgte unter Argon-Atmosphäre in trockenem DMF mit Tetrabutylammoniumhexafluorophosphat als Leitsalz und Ferrocen als interner Standard. Die gemessenen Potentiale wurden mit 0,63 V summiert woraus sich die Vergleichswerte gegen die Normalwasserstoffelektrode (NHE) ergaben^[216].

Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

TEM-Bilder wurden bis November 2011 im zentralen Labor für Elektronenmikroskopie des Universitätsklinikums Regensburg an einem *Leo 912AB* (120 keV) von *ZEISS* angefertigt (**Abb. 82**, **Abb. 83**, **Abb. 91** a und b). Ab November 2011 wurden TEM-Bilder im Laboratorium für Elektronenmikroskopie am Karlsruher Institut für Technologie an einem *Zeiss 912 Omega* (120 keV) angefertigt (**Abb. 81**, **Abb. 91** c und d). Die TEM-Bilder der Zellschnitte (**Abb. 78** in Kapitel 5.2) entstanden im Arbeitskreis von *Prof. Witzgall* am Institut für Anatomie an der Universität Regensburg.

Fluoreszenzmikroskopie

- Die fluoreszenzmikroskopischen Zell Bilder der Upconversion-Nanopartikel, mit und ohne DNA, wurden mit konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie am DFG-Forschungszentrum für Experimentelle Biomedizin in Würzburg an einem *TCS SP5* von *Leica* durchgeführt. Weitere Bauteile sind ein integriertes *DMI 6000* Mikroskop von *Leica* mit einem *HCX PL APO lambda blue 63x/1,4 Öl UV* Objektiv ebenfalls von *Leica*. Der Photo-Detektor wurde auf folgende Messbereiche eingestellt: $\lambda = 540 - 560$ nm für die grün emittierenden UCNPs und $\lambda = 630 - 660$ nm für die rot emittierenden UCNPs. Die Anregung erfolgte bei $\lambda = 980$ nm mit einem Femtosekunden Pulslaser (Ti:Sapphire) von *Maitai HP* bei einer Leistung von 25 - 50 mW.
- Die fluoreszenzmikroskopischen Zell Bilder in Kapitel 5.2 entstanden im Arbeitskreis von *Prof. Witzgall* am Institut für Anatomie der Universität Regensburg an einem *LSM 710* von *Zeiss* bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{exc}} = 480$ nm und einem GFP-Filter.

10.2 Optische Spektroskopie

Bei allen spektroskopischen Messungen wurden Quarzglas-Küvetten der Firma *Starna* ($d = 1\text{ cm}$) mit einem Füllvolumen von 1 mL verwendet. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Messungen bei 20 °C und verschlossenen Küvetten durchgeführt. Bei Temperaturabhängigen Messungen wurden die Probenkammern mit einem kontinuierlichen Stickstoffstrom gespült um ein Beschlagen der Küvetten zu verhindern. Alle DNA Spektren wurden gegen das jeweilige Lösungsmittel (i.d.R. NaP_i-Puffer) basislinienkorrigiert. Soweit nicht anders angegeben setzten sich die Probelösungen wie folgt zusammen:

$$C_{(\text{DNA})} = 2,5\text{ }\mu\text{M}$$

$$C_{(\text{NaPi})} = 10\text{ mM}$$

$$C_{(\text{NaCl})} = 250\text{ mM}$$

UV/Vis Absorptionsspektroskopie

Die UV/Vis- Absorptionsspektren wurden mit einem *Cary 100 Bio* der Firma *Varian* mit Temperatureinheit (*Cary 100 Temperature Controller*) gemessen. Folgende Grundeinstellungen blieben unverändert: SBW: 2,0 nm, Average time: 0,1 s, Data intervall: 1,0, Light source change over: 350 nm.

Schmelztemperaturmessungen wurden in selbigem Gerät mit dem Programm „Thermal“ durchgeführt. Dabei wurde die Absorptionsänderung der DNA bei $\lambda = 260\text{ nm}$ verfolgt. Die Messungen erfolgten aufwärts von 10 – 90 °C und abwärts von 90 – 10 °C. Die Heiz- bzw. Kühl Rate betrug 0,7 °C/min. Die Messdaten wurden in 0,5 °C Schritten erfasst.

Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzspektren wurden an einem *Fluoromax-3* Fluoreszenzspektrometer der Firma *Jobin-Yvon* gemessen. Die Proben wurden mit einem Peltier-Element *LFI-3751* thermostatisiert. Falls nicht anders angegeben wurde bei 20 °C gemessen und die Spektren gegen die Ramanstreuung des Lösungsmittels basislinienkorrigiert. Folgende Grundeinstellungen blieben unverändert: Increment: 1 nm, Integration Time: 0,2 s. Falls nicht anders erwähnt wurden alle CylQ-modifizierten DNA Stränge

mit Spaltbreiten (Slits) von 3 nm gemessen. Die Anregung für CylQ erfolgte üblicherweise bei 495 nm und die Messung ab 500 nm.

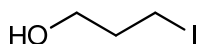
Temperaturabhängige Fluoreszenz wurde über ein Temperatur-Intervall-Programm gesteuert und gemessen. Die Einstellungen ermöglichten eine Messung im Abstand von jeweils $(5 \pm 0,1) ^\circ\text{C}$ bei jeweils 3 min Äquilibrationszeit.

Hinweis: Die Skalierung der Fluoreszenzintensität aller Fluoreszenzspektren ist in der Größenordnung „Millionen“ angegeben (z.B. Fluoreszenzintensität 3 \equiv 3 Mio.). Durch Veränderungen am Fluoreszenzspektrometer (Lampenwechsel) unterscheiden sich die Intensitäten. Ein direkter Vergleich von Fluoreszenzspektren zwischen unterschiedlichen Kapiteln dieser Arbeit ist daher nur begrenzt möglich. Vergleiche müssen daher stets über die Fluoreszenzquantenausbeute erfolgen.

10.3 Synthesevorschriften

10.3.1 Darstellung des Cyaninfarbstoffs CylQ

(1) 3-Iodo-1-propanol



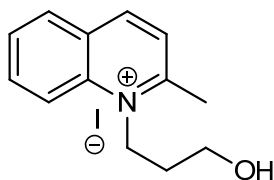
C_3H_7IO
MG: 185,99 g/mol

Es wurden 10 g Natriumiodid (66,7 mmol) in 70 mL Aceton gelöst und 2,65 mL (31,7 mmol) 3-Chloro-1-propanol langsam zu getropft. Die Reaktionsmischung wurde 24 h bei 60 °C gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in 60 mL Wasser gelöst und drei Mal mit 120 mL Diethylether extrahiert. Die organische Phase wurde anschließend über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Es ergaben sich 10 g (53,8 mmol, 85 % d. Th.) Produkt als gelbbraune Lösung.

$n_D^{20} = 1,556$

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm) = 3.65 (t, 2H, $J = 5.9$ Hz), 3.23 (t, 2H, $J = 6.7$ Hz), 2.62 (s, breit, OH), 1.97 (m, 2H).

(2) 1-(3-Hydroxypropyl)-2-methylchinolin-1-ium Iodid



$C_{13}H_{16}INO$
MG: 329,18 g/mol

Unter Argon-Atmosphäre wurden 10,3 g 2-Methylchinolin (72 mmol) und 3,5 mL **1** (36 mmol) in 40 mL 1,4-Dioxan gelöst und über 90 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wurden 40 mL Diethylether zugegeben und die Fällung des

Rohprodukts über Nacht im Kühlschrank vervollständigt. Der Niederschlag wurde abgesaugt, drei Mal mit Diethylether und anschließend mit kaltem Aceton oder Dichlormethan gewaschen. Nach Trocknen unter Hochvakuum wurden 4,31 g (13,1 mmol; 36 % d. Th.) Produkt als hellgrauer Feststoff erhalten.

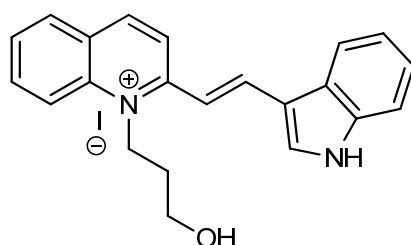
Hinweis: Es sollte immer frisch hergestelltes 3-Iodo-1-propanol verwendet werden.

¹H-NMR (300MHz; DMSO-d₆): δ (ppm) = 9.11 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 8.60 (d, *J* = 9.0Hz, 1H), 8.42 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.27-8.21 (m, 1H), 8.13 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 8.0 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 5.0 (t, *J* = 7.9 Hz, 3H), 3.64 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H), 3.13 (s, breit, 1H), 2.09 (m, 2H).

¹³C-NMR (75 MHz; DMSO-d₆): δ(ppm) = 22.5, 31.1, 49.3, 57.5, 118.8, 125.5, 128.2, 129.0, 130.6, 135.2, 138.3, 145.6, 160.8.

MS (ESI) m/z (%): Berechnet für C₁₃H₁₆NO⁺: 202,1, gefunden: 201,8 (100) [M]⁺.

(3) (E)-2-(2-(1H-indol-3-yl)vinyl)-1-(3-hydroxypropyl)chinolin-1-ium Iodid



C₂₂H₂₁IN₂O
MG : 456,32 g/mol

Unter Argon-Atmosphäre wurden 9,93 g **2** (30,2 mmol) in Ethanol gelöst und für 10 min unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurden 6,6 mL (66,4 mmol) Piperidin zu getropft. Nach 20 min Erhitzen unter Rückfluss (Farbumschlag nach purpur-rot) wurden 13,14 g (90,5 mmol) 1*H*-Indol-3-carbaldehyd in Ethanol gelöst zur Reaktionsmischung zugegeben. Die Lösung wird über Nacht weiter unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlung auf RT wird das Rohprodukt mit Diethylether gefällt. Nach dreimaligem waschen mit Diethylether und Trocknen unter Hochvakuum erhält man das Produkt als dunkel roten Feststoff (12,02 g, 26,33mmol, 87 % d. Th.).

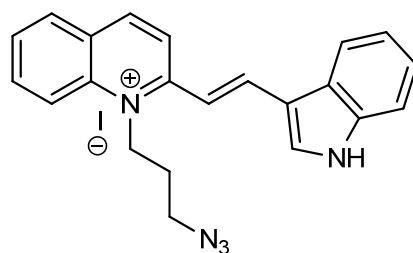
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz; DMSO-d_6), δ (ppm) = 12.33 (s, 1H), 8.83 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 8.70 (d, J = 15.3 Hz, 1H), 8.62 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 8.48 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 8.30-8.24 (m, 3H), 8.12-8.06 (m, 1H), 7.84 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.62-7.55 (m, 2H), 7.35-7.26 (m, 2H), 5.27 (t, J = 4.5 Hz, 1H), 5.03 (t, J = 7.4, 8.0 Hz, 2H), 3.78-3.73 (m, 2H), 2.17-2.16 (m, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, DMSO-d_6), δ (ppm) = 155.9, 143.6, 141.8, 138.3, 137.6, 135.2, 134.2, 130.0, 127.8, 126.8, 124.8, 123.4, 122.0, 120.5, 119.7, 118.3, 114.6, 112.8, 110.3, 57.4, 47.5, 31.1.

MS (ESI) m/z (%): Berechnet für $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}^+$: 329,17, gefunden: 329,0 (100) $[\text{M}]^+$.

HR-MS (FAB) m/z : Berechnet für $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}^+$: 329,17, gefunden: 329,17 $[\text{M}]^+$.

(4) (E)-2-(2-(1H-indol-3-yl)vinyl)-1-(3-azidopropyl)chinolin-1-ium Iodid



$\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{IN}_5$
MG: 481,33 g/mol

Unter Argon-Atmosphäre wurden 660 mg (1,45 mmol) **3** zusammen mit 496 mg (1,89 mmol) Triphenylphosphin in wasserfreiem Acetonitril gelöst. Anschließend wurden 372 μL (1,89 mmol) Diisopropylazodicarboxylat (DIAD) tropfenweise zugegeben (Farbumschlag nach Violett). Danach wurden 407 μL (1,89 mmol) Diphenylphosphorylazid über 15 min zu getropft. Die Reaktionsmischung wurde 24 h bei RT gerührt und weitere 24 h bei 50 °C. Das Rohprodukt wurde anschließend mit Diethylether gefällt wobei die Fällung im Eis Bad vervollständigt wurde. Die Aufreinigung erfolgte über Flash-Säulenchromatographie (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 10:1) und semipräparativer HPLC (Gradient aus MeCN in Wasser, 40-80 % in 25 min, RP- C_{18}). Es konnten 120 mg (0,25 mmol, 17 % d. Th.) Produkt als rot-oranger Feststoff isoliert werden.

DC (CH₂Cl₂/MeOH, 10:1) R_f = 0,25.

IR (DRIFT): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3347 (m), 1593 (m), 1569 (m), 1510 (m), 1347 (w), 1316 (w), 1048 (m).

¹H-NMR (300MHz; DMSO-d₆): δ (ppm) = 2.06 - 2.23 (m, 2H), 3.69 - 3.81 (m, 2H), 4.93 - 5.08 (m, 2H), 5.20 - 5.32 (m, 1H), 7.23-7.34 (m, 2H), 7.50-7,63 (m, 2H), 7.83 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 8.00-8.12 (m, 1H), 8.19 - 8.33 (m, 3H), 8.46 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 8.60 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 8.69 (d, J = 15.3 Hz, 1H), 8.80 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 12.32 (s, 1H).

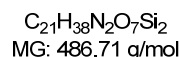
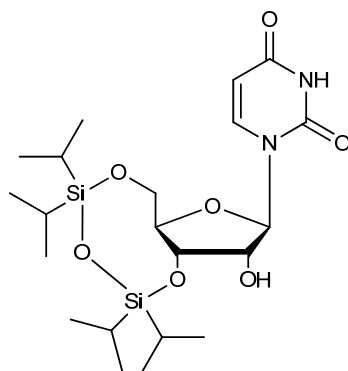
¹³C-NMR (75 MHz. DMSO-d₆): δ (ppm) = 31.1, 47.6, 57.5, 110.3, 112.8, 114.7, 118.4, 119.8, 120.6, 123.5, 124.9, 126.8, 127.9, 130.0, 134.2, 135.2, 137.6, 138.3, 141.8, 143.6, 156.0.

MS (ESI) m/z (%): Berechnet für C₂₂H₂₀N₅⁺: 354,17, gefunden: 354,0 (100) [M]⁺.

10.3.2 Darstellung des 2'-Propargyl modifizierten Uridins

Die Synthese des Alkin-modifizierten Uridins (kU, klick-Uridin) wurde bis auf wenige Änderungen nach Literaturangaben synthetisiert.^[45, 184, 189] Da der Baustein für diese Arbeit eine zentrale Rolle spielt, wird die Synthese an dieser Stelle vollständig aufgeführt. Soweit die Analysendaten denen der Literatur entsprechen werden sie nicht extra aufgeführt.

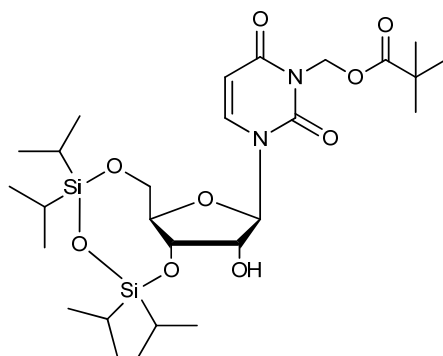
(5) 5'-O-(Tetraisopropyldidiloxan-1,3-diyl)-uridin



Unter Argon-Atmosphäre wurden 4,0 g (16,4 mmol) Uridin in 100 mL abs. Pyridin gelöst und anschließend mit 5,6 mL (18,0 mmol) 1,3-Dichloro-1,1,3,3-tetraisopropyldisiloxan versetzt und 6 h lang bei RT gerührt. Nach Zugabe von 20 mL H₂O wurde die Reaktionslösung mit gesättigter NaHCO₃-Lösung neutralisiert. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand in 100 mL Ethylacetat gelöst und dreimal mit 100 mL H₂O extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet, filtriert und bis zur Trockene eingeeengt. Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Säulenchromatographie gereinigt (SiO₂; DCM/Aceton 4:1). Ausbeute: 6,18 g (12,97 mmol, 78 % d. Th.) farbloser schaumiger Feststoff

DC (DCM/Aceton, 4:1) R_f = 0,23.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur^[184] überein.

(6) 3',5'-O-(Tetraisopropylidisiloxan-1,2-diyl)-N³-pivaloyloxymethyl-uridin

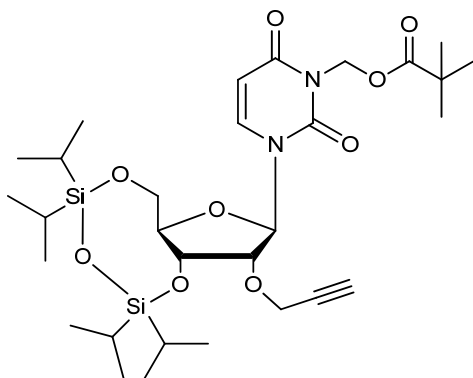
C₂₇H₄₈N₂O₉Si₂
MG: 600,85 g/mol

6,18 g (12,97 mmol) **5** in 250 mL DCM wurden mit 500 mL 0,2 M Na₂CO₃-Lösung und 1,03 g (2,9 mmol) TBAHS versetzt. Anschließend wurden unter Rühren 18,6 mL (123 mmol). Pivaloylmethylchlorid zugegeben und 72 h bei Raumtemperatur gerührt. Die organische Phase wurde zweimal mit 100 mL 5-%iger NaHCO₃-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Rohprodukt im Hochvakuum getrocknet. Nach Reinigung durch Flash-Säulenchromatographie (SiO₂; DCM/MeOH 30:1) wurden 6,44 g (10,79 mmol; 85 % d. Th.) Produkt als farbloser, schaumiger Feststoff erhalten.

DC (DCM/MeOH, 30:1) R_f = 0,5.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur^[184] überein.

(7) **3'-5'-O-(Tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl)-N³-pivaloyloxymethyl-2'-O-propargyluridin**

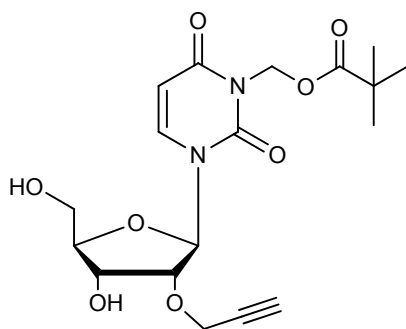


C₃₀H₅₀N₂O₉Si₂
MG: 638,90 g/mol

6,44 g (10,79 mmol) **6** wurden in abs. Acetonitril gelöst und im Eis Bad gekühlt. Es wurden nacheinander 5 mL (19,65 mmol) Phosphazenen-Base P₁-t-Bu und 1,69 mL (16,1 mmol) Propargylbromid zugegeben. Diese Lösung wurde 15 min bei 0 °C und 90 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach Eindampfen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in 50 mL Ethylacetat gelöst und je einmal mit 50 mL 0,5 M Phosphatpuffer und 50 mL gesättigter NaCl-Lösung extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde eingedampft und das Rohprodukt im Hochvakuum getrocknet. Die Reinigung erfolgte über Flash-Säulenchromatographie (SiO₂; DCM/Aceton 25:1). Es wurden 2,69 g (4,21 mmol, 39 % d. Th.) farbloses, schaumiges Produkt erhalten.

DC (DCM/Aceton, 25:1) R_f = 0,7.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur^[184] überein.

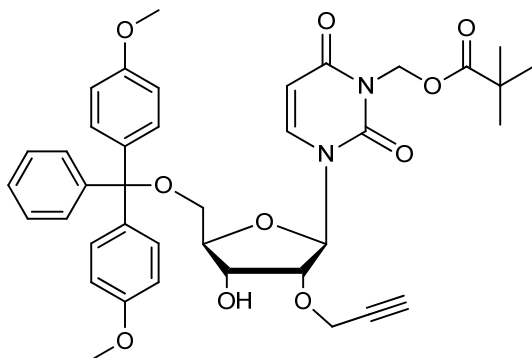
(8) N³-Pivaloyloxymethyl-2'-O-propargyluridin

C₁₈H₂₄N₂O₈
MG: 396,39 g/mol

2,64 g (4,13 mmol) **7** wurden in 40 mL THF gelöst und mit 3,37 mL (20,7 mmol) Et₃N*HF versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Lösungsmittel eingedampft. Der Rückstand wurde in 5 mL MeOH gelöst und mit 1 M NaOH neutralisiert. Nach erneutem Eindampfen des Lösungsmittels erfolgte die Reinigung des Rohproduktes über Flash-Säulenchromatographie (SiO₂; DCM/Aceton, 1,5:1). Es wurden 643 mg (1,6 mmol; 40 % d. Th.) farbloser, schaumiger Feststoff erhalten.

DC (DCM/Aceton, 25:1) R_f = 0,7.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur^[184] überein.

(9) 5'-O-Dimethoxytrityl-N³-pivaloyloxymethyl-2'-O-propargyluridin

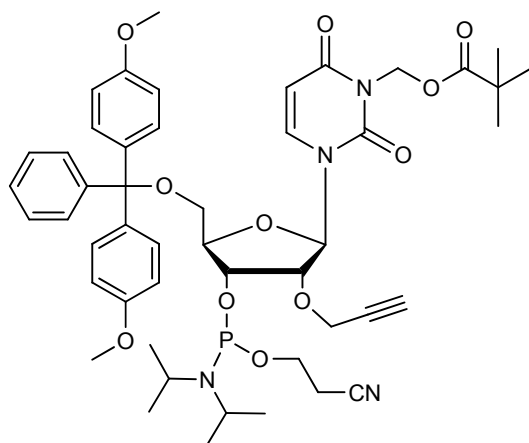
C₃₉H₄₂N₂O₁₀
MG: 698,76 g/mol

Unter Argon-Atmosphäre wurden 643 mg (1,6 mmol) **8** in 15 mL Pyridin gelöst, 886 mg (2,5 mmol) 4,4'-Dimethoxytritylchlorid zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Durch Zugabe von wenigen Tropfen MeOH wurde die Reaktion abgebrochen und anschließend das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde in 50 mL Ethylacetat aufgenommen und mit 1 M Na₂CO₃-Lösung extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet, filtriert und eingedampft. Das Rohprodukt wurde über Flash-Säulenchromatographie gereinigt (SiO₂; Hexan/Ethylacetat 2:1 mit 2 % Et₃N). Es wurden 939 mg (1,34 mmol, 84 % d. Th.) Produkt als farbloser, schaumiger Feststoff erhalten.

DC (Hexan/Ethylacetat 2:1 mit 2 % Et₃N) R_f = 0,13.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur^[184] überein.

(10) 5'-O-Dimethoxytrityl-N³-pivaloyloxymethyl-2'-O-propargyluridin-3'-O-(2-cyanoethyl-N,N-diisopropylphosphoramidit)



C₄₈H₅₉N₄O₁₁P
MG: 898,98 g/mol

Unter Argon-Atmosphäre wurden 300 mg (0,43 mmol) **9** in 10 mL abs. DCM gelöst. Nach Zugabe von 0,18 mL DIPEA und 0,114 mL (0,5 mmol) 2-Cyanoethoxy-diisopropylaminochloro-phosphin wurde die Reaktionsmischung 3 h lang bei RT gerührt. Abschließend wurden nochmals 0,06 mL (0,17 mmol) Phosphoramidit-Cl zugegeben. Nach weiteren 5 min Rühren wurde die Reaktion mit wenigen Tropfen MeOH abgebrochen und das Lösungsmittel entfernt. Anschließend wurde das Rohprodukt über Flash-Säulenchromatographie gereinigt (SiO₂; Hexan/Ethylacetat 1,5:1; 3 % Et₃N) und das Produkt über Nacht lyophilisiert. Es wurden 352 mg (0,39 mmol, 91 % d. Th.) farbloser, schaumiger Feststoff erhalten.

DC (Hexan/Ethylacetat 1,5:1 mit 3 % Et₃N) R_f = 0,5.

³¹P NMR (121 MHz, CD₃CN), δ (ppm) = 151.49, 151.03.

Weitere spektroskopische Daten stimmen mit der Literatur^[184] überein.

10.4 DNA-Synthese

10.4.1 Synthese modifizierter Oligonukleotide

Allgemein

Alle artifiziellen Oligonukleotide wurden vollautomatisch an einem *Expedite 8909 Nucleic Acid Synthesizer* nach der Phosphoramidit-Methode an fester Phase durchgeführt. Für interne- und 5'-DNA-Modifikationen wurden Standard-CPG-Säulen verwendet. Für den Einbau des 2'-O-Propargyl-Uridins am 3'-Ende der DNA, wurden CPG-Säulen von *ChemGenes* verwendet, bei denen der Sonderbaustein bereits als erste Base auf dem CPG immobilisiert war oder über *Universal Support*. Bis November 2010 wurde der 2'-O-Propargyl-Uridin Baustein selbst synthetisiert (s. 10.3.2). Das fertige Phosphoramidit wurde dabei als 0,1 M Lösung (Acetonitril, *amidite diluent* von *Applied Biosystems*) bei der DNA Synthese eingesetzt. Ab November 2010 konnte der Baustein über *ChemGenes* bezogen werden und wurde in derselben Konzentration eingesetzt. Ein Unterschied in der Kupplungseffizienz konnte nie beobachtet werden. Die Kupplungseffizienz wurde dabei über das Absorptionssignal von DMT⁺ ($\lambda = 470 \text{ nm}$), das bei jedem Kupplungsschritt detektiert wird, verfolgt.

Kupplungsprotokolle

Im Kupplungsprotokoll werden die Einzelschritte des Synthesesyklus bei der automatisierten DNA-Festphasensynthese programmiert. Jeder Zyklus besteht aus einer veränderlichen Anzahl an Pulsen, wobei je Puls 16 μL des jeweiligen Reagenzes aus den Vorratsflaschen gefördert werden. Zusätzlich lässt sich die Zeit für jeden Schritt programmieren. Eine Zeitdauer von 0 bedeutet einen schnellstmöglichen Durchlauf des Einzelschrittes ohne zusätzliche Reaktionszeit. Tabelle 18 zeigt das Kupplungsprotokoll, welches für den Einbau des 2'-O-Propargyl-Uridins verwendet wurde. Es entspricht dem Kupplungsprotokoll für den Standarteinbau von T. Erläuterungen zu den in Tabelle 18 verwendeten Abkürzungen:

Dblk: 3 % Dichloressigsäure in Dichlormethan
 Wsh: Acetonitril
 Act: 0,45 M Tetrazol in Acetonitril
 Caps: Acetanhydrid in THF/ Pyridin (Cap A) und N-Methylimidazol in THF/ Pyridin (Cap B)
 Ox: Iod in Wasser/ THF/ Pyridin

Tabelle 18: Kupplungsprotokoll für den Einbau des 2'-O-Propargyl-Uridins und T.

Codierung	Funktion	Modus	Menge	Zeit
\$Deblocking				
144	Index Fract. Coll.	NA	1	0
0	Default	WAIT	0	1.5
141	Trityl Mon. On/Off	NA	1	1
16	Dblk	PULSE	10	0
16	Dblk	PULSE	50	49
38	Diverted Wsh A	PULSE	40	0
141	Trityl Mon. On/Off	NA	0	1
38	Diverted Wsh A	PULSE	40	0
144	Index Fract. Coll.	NA	2	0
\$Coupling				
1	Wsh	PULSE	5	0
2	Act	PULSE	5	0
21	6 bzw. T + Act	PULSE	6	0
21	6 bzw. T + Act	PULSE	1	8
2	Act	PULSE	4	32
1	Wsh	PULSE	7	56
1	Wsh	PULSE	8	0
\$Capping				
12	Wsh A	PULSE	20	0
13	Caps	PULSE	8	0
12	Wsh A	PULSE	6	15
12	Wsh A	PULSE	14	0
\$Oxidizing				
15	Ox	PULSE	15	0
12	Wsh A	PULSE	15	0
\$Capping				
13	Caps	PULSE	7	0
12	Wsh A	PULSE	30	0

Eine Ausnahme stellen die Intrastrangdimere mit Thiazolrot (TR) und CylQ dar. Hier wurde TR bereits während der Synthese als Phosphoramidit in das Oligonukleotid eingebaut. Darauf folgte der Einbau des 2'-O-Propargyl-Uridins. CylQ wurde erst nach Abspaltung und Aufarbeitung der vor-modifizierten DNA verknüpft. Für den Einbau von TR wurde das Protokoll auf 30 Pulse und einer Kupplungszeit von 90 min geändert. Thiazolrot war als Phosphoramidit in der Arbeitsgruppe bereits vorhanden und wurde von Carolin Holzhauser zur Verfügung gestellt.^[266]

10.4.2 Aufarbeitung und Charakterisierung der Oligonukleotide

Nach Abschluss der DNA-Synthese wurden die CPG-Säulen im Hochvakuum getrocknet und anschließend geöffnet. Das CPG wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Zur Abspaltung der Oligonukleotide vom Trägermaterial, sowie zur Entfernung der Schutzgruppen wurde das CPG mit 700 µL konzentrierter Ammoniumhydroxid-Lösung (>25%, *trace select*, *Fluka*) versetzt und über 12 h bei 55 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das CPG über Zentrifugen Filter abgetrennt und zweimal mit 300 µL H₂O gewaschen. Den vereinigten Filtraten wurde in einem Vakuumkonzentrator *Alpha RVC* der Firma *Christ* der Ammoniak entzogen (30 min, 35 °C, 100 mbar). Danach wurden die Proben in flüssigem Stickstoff ausgefroren, lyophilisiert und in 300 µL Wasser gelöst.

- kU-modifizierte DNA für die Klick-Konjugation an Upconversion Nanopartikel wurde im Anschluss über HPLC gereinigt. Dafür wurden die unter 10.1 beschriebenen Methoden verwendet.
- kU-modifizierte DNA für die CylQ-Konjugation wurde nicht vorgereinigt sondern direkt für die Klick-Reaktion eingesetzt. Die Reinigung erfolgte hierbei erst im Anschluss an die Klick-Reaktion, ebenfalls mit den unter 10.1 beschriebenen Methoden.

Charakterisierung und Konzentrationsbestimmung

Alle gereinigten Oligonukleotide wurden massenspektrometrisch (LC-MS ESI) charakterisiert (s. 10.9).

Die Konzentrationen der DNA-Stammlösungen wurden über das *Lambert-Beer'sche* Gesetz mit Hilfe der Absorption bei $\lambda = 260$ nm bestimmt. Dazu wurden in der Regel 2 μL der Stammlösung mit 998 μL H_2O verdünnt und gemessen. Der Extinktionskoeffizient ϵ_{260} eines unmodifizierten DNA-Oligonukleotids (in Wasser) errechnet sich nach folgender Formel:

$$\epsilon = (n_A \cdot \epsilon_A + n_T \cdot \epsilon_T + n_G \cdot \epsilon_G + n_C \cdot \epsilon_C) \cdot 0,9$$

mit

n_{A-C} :	Anzahl der jeweiligen Nukleobasen
ϵ_A	15400 $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$
ϵ_C	7300 $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$
ϵ_G	11700 $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$
ϵ_T	8800 $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$
ϵ_{cU}	10100 $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$
0,9	Korrekturfaktor

ϵ_{A-T} beschreibt die molaren Extinktionskoeffizienten der einzelnen DNA-Basen bei $\lambda = 260$ nm.^[348, 349] Der Korrekturfaktor 0,9 berücksichtigt die Hypochromizität. Der molare Extinktionskoeffizient von CylQ bei $\lambda = 260$ nm wurde experimentell mit $6100 \text{ L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ermittelt und muß bei vergleichenden Messungen mit anderen Farbstoffen berücksichtigt werden. Für Messungen im gleichen System (nur CylQ-DNA) wurde er vernachlässigt.

10.5 Upconversion Nanopartikel

Alle in dieser Arbeit verwendeten Upconversion Nanopartikel (UCNPs) stammen aus dem Arbeitskreis *Prof. Wolfbeis* des Instituts für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik der Universität Regensburg. Sie wurden von *Daniela Achatz* und *Heike Mader* nach der Co-Präzipitationsmethode hergestellt.^[145, 303] Die Partikel sind vom Typ NaYF_4 und wurden mit Yb^{3+} als Sensitizer Ion, und Er^{3+} als emittierendes Aktivator Ion co-dotiert. Der Kern der Partikel wurde in einem Stöber Prozess mit einer Schicht aus SiO_2 überzogen und gleichzeitig azidfunktionalisiert (2-Azidoethyl-trimethyl Orthosilicat).

Die Nanopartikel weisen eine Größenverteilung von 60 – 90 nm auf und liegen in wässriger Kolloiddispersion vor. Die in dieser Arbeit verwendeten Nanopartikel

wiesen üblicherweise einen Partikelgehalt von 1 – 2 mg/mL auf. Bei Anregung mit $\lambda = 980$ nm zeigen die Partikel drei Absorptionsbanden mit Maxima bei $\lambda = 520$, 540 und 655 nm. Vor jeder Konjugation mit DNA wurden TEM Bilder angefertigt um die Dispersivität und Element-Verteilung zu betrachten. Dabei zeigt sich, ob das Silica-coating erfolgreich war und die Nanopartikel für die Verknüpfung mit DNA geeignet sind (s. **Abb. 98**). Zusätzlich wurde mit DLS (*Dynamic Light Scattering*) die Größenverteilung der Nanopartikel gemessen.

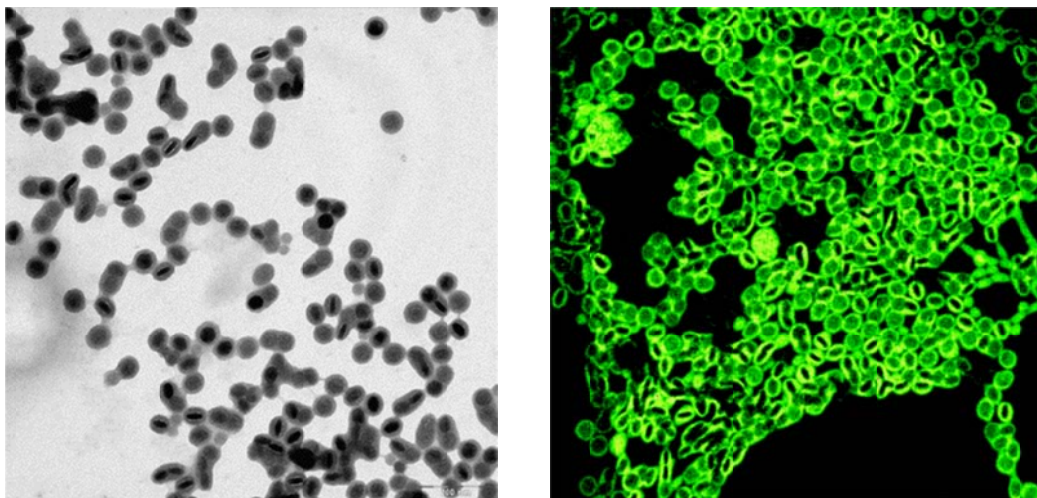


Abb. 98: TEM Bilder von Upconversion Nanopartikeln vor der DNA Konjugation. Links: Typisches Hell Feld TEM Bild von UPCONs mit Kern (schwarz) und $\text{SiO}_2\text{-N}_3$ -Hülle (grau). Rechts: Die Elementauflösung für Si (grün) zeigt das die Partikel mit Si umhüllt sind, und die Kerne ohne Si erscheinen (schwarz).

10.6 Klickreaktion

Grundsätzlich wurden die Klickreaktionen mit CylQ und die Klickreaktionen mit Nanopartikeln unter den gleichen Reaktionsbedingungen durchgeführt. In beiden Fällen wurden Stammlösungen aus Na-Ascorbat, TBTA-Ligand, Cu(I)-Komplex und dem jeweiligen Azid hergestellt und die entsprechenden Äquivalente zur DNA pipettiert.

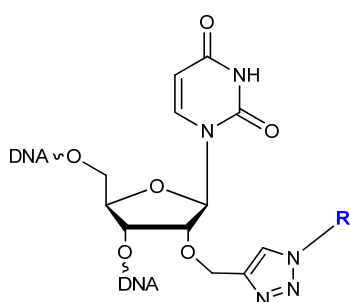


Abb. 99: Postsynthetische Klick-Konjugation von CylQ (R) bzw. Upconversion-Nanopartikeln (R) unter Bildung eines 1,4-disubstituierten 1,2,3-Triazols.

Die Klick-Reaktionen unterscheiden sich jedoch in ihrer Aufarbeitung und der Probenvorbereitung. Für Nanopartikel wurden ausschließlich HPLC-reine Oligonukleotide verwendet. Für alle anderen Klickreaktionen wurde die DNA direkt nach dem Abspalten vom CPG verwendet.

10.6.1 Klickreaktion von Oligonukleotiden mit CylQ

Zur DNA (lyophilisiert oder in 100 μL H_2O gelöst) werden nacheinander je 25 μL (10 μmol) Natriumascorbat-Lösung (400 mM in H_2O), 34 μL (3,4 μmol) TBTA-Lösung (100 mM in DMSO/ $t\text{BuOH}$), 17 μL (1,7 μmol) Tetrakis(acetonitril)kupfer(I)-hexafluorophosphat-Lösung (100 mM in DMSO/ $t\text{BuOH}$ 3:1) und 114 μL (1,14 μmol) einer Lösung des Azids (10 mM in DMSO/ $t\text{BuOH}$ 3:1) gegeben. Es wird kurz aufgeschlämmt und 15 h bei RT geschüttelt. Anschließend wird das Lösungsmittel entfernt (Speedvac: 40 $^{\circ}\text{C}$, 0,1 mbar, 6 h). Der Rückstand wird mit 100 μL (0,15 mmol) Natriumacetat-Lösung (300 mM in H_2O) versetzt und für eine Stunde bei RT stehen gelassen. Danach wird 1 mL EtOH zugegeben, geschüttelt und über Nacht bei -38°C aufbewahrt (DNA-Präzipitation). Am nächsten Tag wird für 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand vom abpipettiert. Der Rückstand wird

mit 1 mL EtOH (70 Vol.-%) gewaschen, erneut abzentrifugiert (15 min, 13000 rpm) und der Überstand entfernt. Das DNA-Pellet wird abschließend in 500 µL Wasser aufgenommen und kann direkt für die SEC (Entsalzen) verwendet werden. Bei doppel- und dreifach-Modifikationen wurden auch jeweils die doppelten Äquivalente (außer DNA) an Klickreagenzien und Azidfarbstoff verwendet.

Entsalzen und Reinigen

Im Anschluss an die Klick-Reaktion müssen die DNA-Stränge von überschüssigen Kupfersalzen und anderen kleineren Molekülen befreit werden. Dazu führt man eine Größenausschlusschromatographie mit *illustra NAP-5-Säulen* durch. Die Säulen werden zunächst mit 10 mL eines 5 mM Ammoniumacetatpuffers (pH = 6,5) equilibriert. Anschließend wird die DNA-Lösung (max. 500 µL) aus der Klickreaktion auf die Säule aufgebracht. Nach vollständigem Einsickern der Lösung wird mit 1 mL Puffer die DNA eluiert.

Für die präparative HPLC wird die Probe lyophilisiert und in 300 µL Wasser aufgenommen. Die HPLC Trennung erfolgte mit den in Tabelle 17 beschriebenen Methoden. Die fertig gereinigten Stränge wurden mit LC-MS (ESI) analysiert. Eine typische Klick-Reaktion von CylQ an DNA verlief mit Ausbeuten von 60 – 70 % d. Th.

10.6.2 Klickreaktion von DNA mit Upconversion-Nanopartikeln

Zur lyophilisierten DNA (200 – 250 nmol) werden nacheinander je 25 µL (10 µmol) Natriumascorbat-Lösung (400 mM in H₂O), 34 µL (3,4 µmol) TBTA-Lösung (100 mM in DMSO/*t*BuOH), 17 µL (1,7 µmol) Tetrakis(acetonitril)kupfer(I)-hexafluorophosphat-Lösung (100 mM in DMSO/*t*BuOH 3:1) und 1,5 mg Azid-Nanopartikel (z.B. 750 µL einer UCNP-Lösung mit 2 mg/mL Partikelgehalt;) gegeben. Es wird kurz aufgeschlämmt und 15 h bei RT geschüttelt. Anschließend wird das Lösungsmittel entfernt (Speedvac: 40 °C, 0,1 mbar, 6 h). Der Rückstand wird mit 100 µL (0,15 mmol) Natriumacetat-Lösung (300 mM in H₂O) versetzt und für eine Stunde bei RT stehen gelassen. Im Anschluss werden 400 µL Wasser zugegeben und die Probe im Ultraschallbad (5 min) und auf der Rüttelplatte (ca. 2h) homogen resuspendiert bis keine größeren Partikel mehr zu sehen sind. Die Suspension wird nun direkt für die SEC verwendet (s. 10.6.3).

Hinweis: Es wurde stets ein Überschuss an DNA für die Klick-Reaktion eingesetzt um eine möglichst quantitative Umsetzung und damit dichte Oberflächen-funktionalisierung zu erhalten. Eine Angleichung der Equivalente liefert die Stoffmenge an Azidosilan das für die UCNP-Funktionalisierung verwendet wurde. Üblicherweise gilt: 1 mg Partikel \approx 50 nmol N_3 . Die besten Ergebnisse wurden erzielt wenn 75 nmol Azid (UCNPs) mit 200 – 250 nmol DNA eingesetzt wurden.

10.6.3 Aufarbeitung und Reinigung von UCNP-DNA-Konjugaten

Um UCNP-DNA-Konjugate zu Reinigen und von überschüssiger DNA zu trennen, wird eine GPC (SEC) bei 60 °C durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dies in leergeräumten Trockenschränken durchgeführt um bei dieser Temperatur zu arbeiten. Puffer, Säulen, Probe usw. werden auf mind. 60 °C vorgeheizt. Als Säulen wurden neu befüllte *NAP-5* Säulen von *GE-Healthcare* mit einem *illustra™Sephadex™ G-50 (Fine DNA Grade)* SEC-Gel verwendet. Zum Bau der Säulen s. 10.1 Materialien, Geräte und allgemeine Methoden.

Die Säulen werden mit 10 mL eines 5 mM Ammoniumacetatpuffers (pH = 6,5) equilibriert. Anschließend wird die DNA-UCNP-Suspension (500 μ L) aus der Klickreaktion auf die Säule aufgebracht. Nach vollständigem Einsickern werden in 500 μ L-Schritten ca. 8 Fraktionen mit Puffer eluiert. Die Fraktionen, welche Nanopartikel enthalten, werden mit Hilfe von Dynamischer Lichtstreuung (DLS) ermittelt. Die Partikel finden sich üblicherweise in Fraktion 3 und 4. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereint und bis zum gewünschten Volumen lyophilisiert (nie ganz lyophilisieren, da ein Resuspendieren nicht mehr möglich ist). Die Proben wurden je nach Anwendung entweder direkt verwendet oder ein 10 mM Natriumphosphatpuffer mit 250 mM NaCl eingestellt. Die Charakterisierung erfolgte mittels TEM, DR-FTIR-Spektroskopie, DLS und Konzentrationsbestimmung der DNA vor und nach der Reaktion.

10.7 Untersuchungen von CylQ-DNA

Allgemein

Falls nicht anders angegeben wurde bei allen Untersuchungen eine 2,5 μM DNA-Lösung in 10 mM NaPi-Puffer (pH = 7) mit 250 mM NaCl gemessen. Die Verhältnisse von Strang- und Gegenstrang unterscheiden sich wie folgt:

Tabelle 19: Stoffmengenverhältnisse zwischen Strang- und Gegenstrang modifizierter und unmodifizierter DNA.

Strang	Gegenstrang	Verhältnis Strang / Gegenstrang
einfach- oder mehrfach-modifiziert	unmodifiziert	1 / 1,2 (2,5 nmol / 3 nmol)
einfach- oder mehrfach-modifiziert	einfach- oder mehrfach-modifiziert	1 / 1 (2,5 nmol / 2,5 nmol)

Fertig pipettierte Proben wurden vor allen Messungen für 10 min bei 90 °C erhitzt und danach langsam wieder auf RT abgekühlt. Absorptions- und Fluoreszenzmessungen erfolgten unter den in 10.1 beschriebenen Einstellungen.

Absorptions- und Fluoreszenztitration

Für die Absorptions- und Fluoreszenztitration wurde ein unmodifizierter DNA-Doppelstrang (CP26 und WAC23 s. unten; *Metabion*) und der CylQ-Alkylalkohol **3** verwendet. Es wurden 500 μL einer 24 μM (CylQ) Titrations-Stammlösung (mit 50 mM NaPi-Puffer, pH = 7) und 610 μL einer 28 μM (CylQ) Titrationslösung (mit 25 μM DNA, 50 mM NaPi-Puffer, pH = 7) hergestellt. Stammlösung und Titrationslösung enthalten beide den Farbstoff um keinen Verdünnungseffekt zu erhalten. Für die Messung wurde in 5, 10, 20, und 50 μL Schritten Stammlösung zur Titrationslösung direkt in die Küvette pipettiert. Es wurde nach jedem Schritt geschüttelt und nach zwei Minuten die Absorption und Fluoreszenz gemessen.

CP26: 5'- T-C-A-G-T-G-A-T-C-T-A-G-A-C-T-G-C -3'
WAC23: 3'- A-G-T-C-A-C-T-A-G-A-T-C-T-G-A-C-G -5'

Photostabilität

Alle DNA-Farbstoff Proben wurden in der üblichen Konzentration (2,5 μM in 10 mM NaPi-Puffer mit 250 mM NaCl) verwendet. Doppelsträngige Proben wurden vorher hybridisiert. Die Bestrahlung erfolgte mit einer 75 W Xe-Bogenlampe von *LOT-Oriel* und einem 305 nm Langpass- (cut-off) Filter. Die Lampe wurde so justiert, dass der Brennpunkt in die Küvette fiel. Die Proben wurden für die jeweilige Zeitdauer im abgedunkelten Abzug bestrahlt. Anschließend wurde unverzüglich die UV/Vis Absorption und Fluoreszenz gemessen. Auf eine Kühlung der Proben wurde verzichtet, da kein relevanter Temperaturanstieg festgestellt wurde. Die Messungen BODIPY- und Fluorescein markierter DNA wurden von *Dr. Thomas Ehrenschwender* durchgeführt. Cy3 wurde zum einen am 5'-Ende der DNA verknüpft (*Metabion*) und zum anderen wie in vorherigen Arbeiten direkt in die DNA eingebaut.^[25] Thiazolrot wurde wie in Kapitel 4.4.2 gezeigt verknüpft. Die Struktur und Verknüpfung von BODIPY und Thiazolorange ist in Abbildung 100 dargestellt.

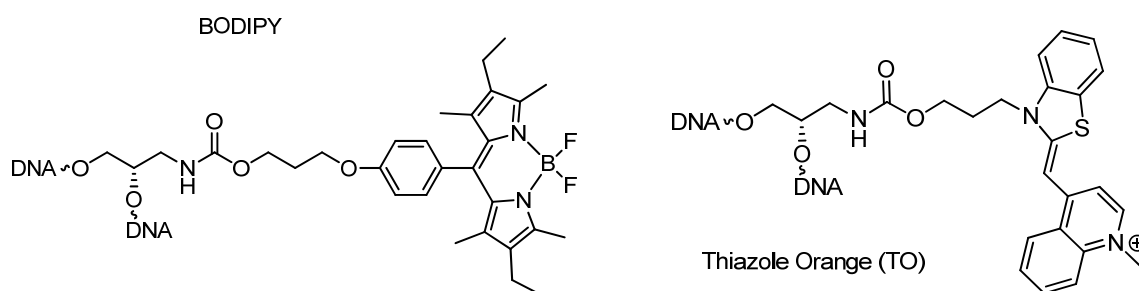


Abb. 100: Strukturformeln und Verknüpfung in DNA von BODIPY und Thiazolorange, wie sie bei den Versuchen zur Photostabilität zum Einsatz kamen.

Fluoreszenzquantenausbeute

Die Fluoreszenzquantenausbeuten wurden über eine basische (0,1 M NaOH) Fluoresceinlösung als Standard bestimmt. Nach der *Weber-Teale* Methode hat Fluorescein eine Quantenausbeute von 92 %.^[350] Für die Messung wurde die Absorption im Bereich der Maxima an das der CyIQ-DNA angeglichen und im geeigneten Schnittpunkt angeregt. Die Quantenausbeuten für CyIQ wurden anschließend wie folgt berechnet:

$$\Phi_{Probe} = \Phi_{Standard} \cdot \frac{A_{Standard} \cdot n_{Probe}^2 \cdot F_{Probe}}{A_{Probe} \cdot n_{Standard}^2 \cdot F_{Standard}}$$

mit:

$\Phi_{Standard} = 0,92$ (Fluorescein)^[350]

A: Absorption bei Anregungswellenlänge

n = 1,33 (H₂O bei 20 °C)

F: integrierte Fluoreszenzintensität

Am Beispiel für dsDNA1 ergibt sich: $\Phi_{dsDNA1} = 0,08$

Experimentell ermittelt: $A_{Standard} = 0,11052$; $A_{dsDNA1} = 0,1037$;
 $F_{Standard} = 5,1 \times 10^8$ (slits2); $F_{dsDNA1} = 3,88 \times 10^7$ (slits2)

10.8 Zellkulturen und Versuche

Fluoreszenzmikroskopie von UCNP-DNA Konjugaten in Zellen

Für die Zellversuche in Zusammenhang mit der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie von UCNPs und UCNP-DNA Konjugaten wurden NRK Zellen des Stammes 52 E (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig) in einer 96-well Mikrotiterplatte (*ibidi GmbH*, Martinsried) verwendet. Dabei handelt es sich um epithelähnliche, adhärent wachsende Zellen. Sie bilden Monolayer mit der für Epithelzellen typischen Pflastersteinmorphologie aus. Die Probelösung setzte sich aus 0,1 mg bzw. 0,5 mg Partikeln in 300 μ L *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) mit 4,5 g/L D-Glucose mit 10 Vol.-% FKS, 100 μ g/L Penicillin/Streptomycin und L-Glutamin (2 mM) zusammen. Die Osmolarität wurde über Zugabe von 10 x PBS eingestellt. Die Zellen wurden nach Zugabe der Nanopartikel für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS⁺⁺ (PBS mit CaCl₂ und MgCl₂) gewaschen und für 10 min mit Paraformaldehyd (4 % in PBS⁺⁺) fixiert. Die fixierten Kulturen wurden abschließend zweimal mit Puffer gewaschen. Die Kulturen wurden im Arbeitskreis *Prof. Wegener* von *Judith Stolwijk* am Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik der Universität Regensburg gezüchtet. Die Fluoreszenzmikroskopie an sich wurde wie unter 10.1 beschrieben am DFG-

Forschungszentrum für Experimentelle Biomedizin in Würzburg bei *Prof. Gregory Harms* durchgeführt.

Cytotoxizität

Die Zellkulturen und Versuche zur Cytotoxizität wurden am Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik der Universität Regensburg im Arbeitskreis von *Prof. Wegener* von *Michaela Sperber* durchgeführt. Für die Zellkulturen wurden NRK- (*Normal Rat Kidney*) Zellen vom Typ NRK-52E von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig bezogen. Sie stammen ursprünglich aus der Niere von Ratten der Spezies *Rattus norvegicus*. Dabei handelt es sich um epithelähnliche, adhärent wachsende Zellen. Sie bilden Monolayer mit der für Epithelzellen typischen Pflastersteinmorphologie aus. Das zur Kultur verwendete Nährmedium setzt sich wie folgt zusammen: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) mit 3.7 g/L NaHCO₃ und 4.5 g/L D-Glukose, 5 % (v/v) FCS, 1 mM L-Glutamin, 100 µg/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin.

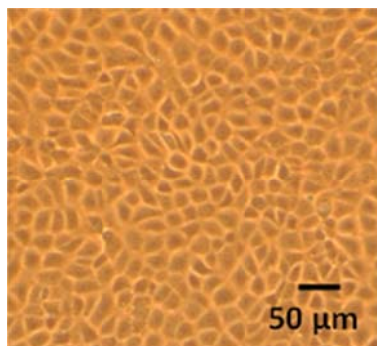


Abbildung 101: Mikroskopische Aufnahme der verwendeten NRK-Zellen.

Alamar Blue Assay

Die Stammlösungen der Proben wurden für 10 Min im Ultraschallbad behandelt und anschließend 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:10000 (0,1 mg/mL – 0,01 µg/mL) mit PBS⁺⁺/Glucose (1 mM Ca²⁺, 0,5 mM Mg²⁺, 1 g/L D-Glucose in PBS⁻) verdünnt. Pro Well wurde ein Volumen von 200 µL verwendet. Morgens wurden die Zellen auf serumfreies Medium umgestellt. Die Zellen wurden mit den entsprechenden Partikellösungen 24 h bei 37 °C inkubiert. Nach 23 h erfolgte die Zugabe einer 0,5 %igen Triton Lösung in die entsprechenden Kontrollwells, wodurch die Zellen gezielt permeabilisiert wurden. Anschließend wurden die Lösungen abgenommen

und je 200 μL der Alamar Blue Lösung (1:10 in PBS^{++} / Glucose, *invitrogenTM*) zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von ca. 15 h wurde die Fluoreszenz der verschiedenen Proben mit dem Ascent Reader gemessen ($\lambda_{\text{exc}} = 544 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$).

Korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie

Die Zellkulturen wurden am Institut für Anatomie der Universität Regensburg im Arbeitskreis von *Prof. Witzgall* von *Sabrina Kracher* gezüchtet und präpariert. Es wurde eine Linie von LLC-PK1 Zellen verwendet. Die Zellen wurden in DMEM Medium zunächst für 4 h ohne FCS mit einer Mischung aus DAB und **DNA20** inkubiert (1 μL aus einer 1 mM bzw. 100 μM Lösung von **DNA20** auf 249 μL DMEM-Medium). Anschließend noch weitere 27 h Inkubation mit FCS. Nach Fixierung mit Glutaraldehyd wurde über die Probe Diaminobenzidin gegeben. Danach wurde im LSM mikroskopiert.

10.9 Liste verwendeter DNA-Sequenzen

CyIQ-modifizierte Oligonukleotide (Monomere)

DNA1	3'- C-A-G-T-C-A- Cy^{IQ} -T-G-A-C-G-T-A-C-G-T - 5'
DNA2	3'- A-G-T-C-A-C-T-T- Cy^{IQ} -T-T-C-T-G-A-C-G - 5'
DNA3	3'- A-G-T-C-A-C-T-C- Cy^{IQ} -C-T-C-T-G-A-C-G - 5'
DNA4	3'- A-G-T-C-A-C-T-G- Cy^{IQ} -G-T-C-T-G-A-C-G - 5'
DNA5	3'- A-G-T-C-A-G-A-T- Cy^{IQ} -T-A-G-T-G-A-C-T - 5'
DNA6	3'- C-G-T-C-A-G-A-T-A- Cy^{IQ} -A-G-T-G-A-C-T - 5'
DNA7	3'- C-A-G-T-C-A-A- Cy^{IQ} -T-G-A-C-G-T-A-C-G - 5'
DNA8	3'- C-G-T-A-C-G-T-C-A-A- Cy^{IQ} -T-G-A-C-T-G - 5'
DNA9	3'- C-A-G-T-C-A- Cy^{IQ} -A-T-G-A-C-G-T-A-C-G - 5'
DNA10	3'- C-G-T-A-C-G-T-C-A- Cy^{IQ} -A-T-G-A-C-T-G - 5'

Tabelle 20: Übersicht , MS-Analytik und molare Extinktionskoeffizienten zu den einfach CylQ-modifizierten Strängen **DNA1-10**.

DNA-Strang	Arbeits- bezeichnung	berechnete Masse [g/mol]	gefundene Masse [g/mol]	ϵ_{260} [L* mol^{-1} *cm $^{-1}$]
DNA1	MMR25	5577,5	1393,6 [M-5H] $^{4-}$ 1858,7 [M-4H] $^{3-}$	165000
DNA2	MMR21	5543,5	1385,5 [M-5H] $^{4-}$ 1848,0 [M-4H] $^{3-}$	156000
DNA3	MMR23	5513,5	1378,1 [M-5H] $^{4-}$ 1838,0 [M-4H] $^{3-}$	153000
DNA4	MMR24	5593,5	1398,0 [M-5H] $^{4-}$ 1864,6 [M-4H] $^{3-}$	161000
DNA5	MMR29	5616,5	1403,8 [M-5H] $^{4-}$ 1872,4 [M-4H] $^{3-}$	173000
DNA6	MMR30	5601,5	1400,0 [M-5H] $^{4-}$ 1867,3 [M-4H] $^{3-}$	172000
DNA7	MMR39	5586,5	1395,9 [M-5H] $^{4-}$	170000
DNA8	MMR40	5577,5	1393,6 [M-5H] $^{4-}$	165000
DNA9	MMR42	5586,5	1395,9 [M-5H] $^{4-}$	171000
DNA10	MMR41	5577,5	1393,7 [M-5H] $^{4-}$	165000

TR-modifizierte Oligonukleotide

Die TR-modifizierten Stränge **DNA11-14** wurden von *Carolin Holzhauser* synthetisiert und von ihr bereitgestellt (in Klammern die jeweilige Arbeitsbezeichnung).

DNA11	3'- C-A-G-T-C-A-A- TR -T-G-A-C-G-T-A-C-G- 5'	(ch38)
DNA12	5'- G-T-C-A-G-T- TR -A-A-C-T-G-C-A-T-G-C- 3'	(ch39)
DNA13	3'- C-A-G-T-C-A- TR -A-T-G-A-C-G-T-A-C-G- 5'	(ch40)
DNA14	5'- G-T-C-A-G-T-A- TR -A-C-T-G-C-A-T-G-C- 3'	(ch41)

CylQ- und TR- modifizierte OligonukleotideDNA15 3'- C-A-G-T-C-A-**TR-Cy^{IQ}**-T-T-G-A-C-G-T-A-C- 5'DNA16 3'- C-A-G-T-C-A-**TR-A-Cy^{IQ}**-A-C-G-T-A-C-G-T- 5'

Tabelle 21: Übersicht , MS-Analytik und molare Extinktionskoeffizienten zu den CylQ- und TR-modifizierten Strängen.

DNA-Strang	Arbeits- bezeichnung	berechnete Masse [g/mol]	gefundene Masse [g/mol]	ϵ_{260} [L*mol ⁻¹ *cm ⁻¹]
DNA15	TO3cU1	5803,1	1449,9 [M-6H] ⁴⁺ 1934,0 [M-5H] ³⁻	154000
DNA16	TO3cU2	5812,1	1452,1 [M-6H] ⁴⁺ 1936,4 [M-5H] ³⁻	160000

Mehrfach CylQ-modifizierte Oligonukleotide (Dimere, Trimere)DNA17 3'- C-A-G-T-C-A-**Cy^{IQ}-Cy^{IQ}**-T-T-G-A-C-G-T-A-C- 5'DNA18 3'- C-A-G-T-C-G-**Cy^{IQ}-Cy^{IQ}**-C-T-G-A-C-G-T-A-C- 5'DNA20 5'- AGC-TTA-CCG-CG**Cy^{IQ}**-ATT-TCA-AC**Cy^{IQ}**C-GTA-CCG-G- 3'DNA21 5'- GAT-CCC-GGT-ACG-AC**Cy^{IQ}**T-GAA-AC**Cy^{IQ}**A-CGC-GGT-A- 3'DNA22 5'- AGC-TTA-CCG-CG**Cy^{IQ}**-AT**Cy^{IQ}**-TCA-AC**Cy^{IQ}**C-GTA-CCG-G- 3'

Tabelle 22: Übersicht , MS-Analytik und molare Extinktionskoeffizienten zu den mehrfach CylQ-modifizierten Strängen.

DNA-Strang	Arbeits- bezeichnung	berechnete Masse [g/mol]	gefundene Masse [g/mol]	ϵ_{260} [L*mol ⁻¹ *cm ⁻¹]
DNA17	MMR37	5947,1	1485,9 [M-5H] ⁴⁺	163000
DNA18	MMR55	5948,1	1486,1 [M-6H] ⁴⁺	159000
DNA20	MMR46	9324,7	1553,1 [M-8H] ⁶⁻ 1864,0 [M-7H] ⁵⁻	265000
DNA21	MMR47	9422,7	1569,3 [M-8H] ⁶⁻ 1883,5 [M-7H] ⁵⁻	270000
DNA22	MMR48	10121,4	(zu groß für MS)	294000

Klick-Uridin modifizierte Oligonukleotide für Upconversion-Nanopartikel

DNA23	5' - kU -C-A-G-T-G-A-T-C-T-A-G-A-C-T-G-C- 3'
DNA24	3' - C-G-T-A-C-G-A-T-A-T-A-G-C-A-T-G- kU - 5'
DNA25	3' - A-G-T-A-C-G-A-T-A-T-A-G-C-A-T-G- kU - 5'
DNA26	5' - kU -C-A-T-G-C-T-A-T-A-T-C-G-T-A-C-A- 3'
DNA27	3' - A-G-T-C-A-C-T-A-A-A-T-C-T-G-A-C- kU - 5'

Tabelle 23: Übersicht , MS-Analytik und molare Extinktionskoeffizienten zu den mit klick-Uridin (kU; 2'-O-Propargyl-Uridin) modifizierten Strängen für Nanopartikel.

DNA-Strang	Arbeits- bezeichnung	berechnete Masse [g/mol]	gefundene Masse [g/mol]	ϵ_{260} [L* mol^{-1} * cm^{-1}]
DNA23	MMR19C	5223,1	1305,5 [M-4H] ⁴⁺ 1741,2 [M-3H] ³⁻	165000
DNA27	MMR28A-C	5182,1	1294,9 [M-4H] ⁴⁺ 1726,8 [M-3H] ³⁻	165000
DNA24	MMR31A-H	5247,1	1311,6 [M-4H] ⁴⁺ 1749,1 [M-3H] ³⁻	172000
DNA25	MMR34	5271,1	1317,6 [M-4H] ⁴⁺ 1757,2 [M-3H] ³⁻	179000
DNA26	MMR35	5182,1	1295,2 [M-4H] ⁴⁺	165000

11 Literaturverzeichnis

- [1] A. Chakravarti, *Nature* **2001**, 409, 822-823.
- [2] R. L. Jirtle, M. K. Skinner, *Nature Rev. Gen.* **2007**, 8, 253-262.
- [3] C. D. Davis, J. Milner, *Mut. Res.* **2004**, 551, 51-64.
- [4] P. Spork, *Der zweite Code: Epigenetik - oder wie wir unser Erbgut steuern können*. 1. Ausg.; Rowohlt Verlag: **2009**.
- [5] A.-C. Syvänen, *Nature Rev. Genet.* **2001**, 2, 930-942.
- [6] C. Bond, K. S. LaForge, M. Tian, D. Melia, S. Zhang, L. Borg, J. Gong, J. Schluger, J. A. Strong, S. M. Leal, J. A. Tischfield, M. J. Kreek, L. Yu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 9608-9613.
- [7] R. Sachidanandam, *et al.*, *Nature* **2001**, 409, 928-933.
- [8] A. J. Brookes, *Gene* **1999**, 234, 177-186.
- [9] C. M. Ulrich, E. L. Goode, J. D. Potter, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2002**, 11, 1513-1530.
- [10] T. Emahazion, L. Feuk, M. Jobs, S. L. Sawyer, D. Fredman, D. St Clair, J. A. Prince, A. J. Brookes, *Trends Gen.* **2001**, 17, 407-413.
- [11] M. V. Relling, T. Dervieux, *Nature Rev. Cancer* **2001**, 1, 99.
- [12] J. J. McCarthy, R. Hilfiker, *Nature Biotechnol.* **2000**, 18, 505-508.
- [13] M. C. Poirier, *Nature Rev. Cancer* **2004**, 4, 630-637.
- [14] S. D. Bruner, D. P. G. Norman, G. L. Verdine, *Nature* **2000**, 403, 859-866.
- [15] E. C. Friedberg, *Nature* **2003**, 421, 436-440.
- [16] J. H. J. Hoeijmakers, *Nature* **2001**, 411, 366-374.
- [17] A. N. Bullock, A. R. Fersht, *Nature Rev. Cancer* **2001**, 1, 68-76.
- [18] T. Crook, A. Sullivan, N. Syed, M. Gasco, D. Bergamaschi, G. Trigiante, M. Attard, L. Hiller, P. J. Farrell, P. Smith, X. Lu, *Oncogene* **2004**, 23, 3328-3337.
- [19] T. Crook, D. Bergamaschi, M. Gasco, L. Hiller, A. Sullivan, N. Syed, G. Trigiante, I. Yulug, M. Merlano, G. Numico, A. Comino, M. Attard, O. Reelfs, B. Gusterson, A. K. Bell, V. Heath, M. Tavassoli, P. J. Farrell, P. Smith, X. Lu, *Cancer Cell* **2003**, 3, (4), 387-402.
- [20] B. Vogelstein, D. Lane, A. J. Levine, *Nature* **2000**, 408, 307-310.
- [21] C. C. Mello, D. Conte, *Nature* **2004**, 431, 338-342.

- [22] N. J. Caplen, S. Parrish, F. Imani, A. Fire, R. A. Morgan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 9742-9747.
- [23] S. Berndl, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 2418-2421.
- [24] C. Holzhauser, H. A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 7268-7272.
- [25] F. Menacher, M. Rubner, S. Berndl, H.-A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 4263-4266.
- [26] Olympus America Inc.: Homepage - Fluorescence Digital Image Gallery, November **2011**.
- [27] R. Huisgen, *The Adventure Playground of Mechanisms and Novel Reactions (Autobiographie)*. Am. Chem. Soc.: **1994**.
- [28] B. A. Armitage, *Top. Curr. Chem.* **2005**, 253, 55-76.
- [29] A. Mishra, R. K. Behera, B. K. Mishra, G. B. Behera, *Chem. Rev.* **2000**, 100, 1973-2011.
- [30] M. Klessinger, *Chem. in unserer Zeit* **1978**, 12, 1-11.
- [31] M. Levitus, S. Ranjit, *Quart. Rev. Biophys.* **2011**, 44, 123-151.
- [32] E. Akesson, V. Sundstrom, T. Gillbro, *Chem. Phys. Lett.* **1985**, 121, 513-522.
- [33] J. E. I. Korppitommola, A. Hakkarainen, T. Hukka, J. Subbi, *J. Phys. Chem.* **1991**, 95, 8482-8491.
- [34] W. Sibbett, J. R. Taylor, D. Welford, *Ieee J. Quantum Electr.* **1981**, 17, 500-509.
- [35] Q. Li, Y. Kim, J. Namm, A. Kulkarni, G. R. Rosania, Y.-H. Ahn, Y.-T. Chang, *Chem. Biol.* **2006**, 13, 615-623.
- [36] Y. T. Chang, Q. Li, *Nature Prot.* **2006**, 1, 2922-2932.
- [37] G. Rosania, Q. Li, Y.-T. Chang, *US 2008/0064037 A1*, U. S. Patent Appl. Publ. **2008**.
- [38] T. Deligeorgiev, A. Vasilev, S. Kaloyanova, J. J. Vaquero, *Color. Techn.* **2010**, 126, 55-80.
- [39] J. P. Morgan, M. Daniels, *Photochem. Photobiol.* **1980**, 31, 101-113.
- [40] J. R. Lakowicz, B. Shen, Z. Gryczynski, S. D'Auria, I. Gryczynski, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, 286, 875-879.
- [41] H.-A. Wagenknecht, *Charge Transfer in DNA: From Mechanism to Application*. Wiley-VCH: Weinheim, **2006**.

- [42] H.-A. Wagenknecht, *Curr. Org. Chem.* **2004**, 8, 251-266.
- [43] S. H. Weisbrod, A. Marx, *Chem. Commun.* **2008**, 5675-5685.
- [44] J. Schoch, M. Wiessler, A. Jäschke, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 8846-8847.
- [45] P. M. Gramlich, C. T. Wirges, A. Manetto, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 8350-8358.
- [46] M. Shelbourne, X. Chen, T. Brown, A. H. El-Sagheer, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 6257-6259.
- [47] K. Gutsmedl, D. Fazio, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2010**, 16, 6877-6883.
- [48] K. Gutsmedl, C. T. Wirges, V. Ehmke, T. Carell, *Org. Lett.* **2009**, 11, 2405-2408.
- [49] R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, 2, 565-598.
- [50] R. Huisgen, *1,3 Dipolar Cycloaddition Chemistry*, Wiley, New York **1984**, 1-176.
- [51] V. V. Rostovstev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2596-2599.
- [52] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057-3064.
- [53] P. M. E. Gramlich, C. T. Wirges, A. Manetto, T. Carell, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 8478-8487.
- [54] A. H. El-Sagheer, T. Brown, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 1388-1405.
- [55] M. van Dijk, D. T. S. Rijkers, R. M. J. Liskamp, C. F. van Nostrum, W. E. Hennink, *Bioconj. Chem.* **2009**, 20, 2001-2016.
- [56] I. Singh, J. S. Vyle, F. Heaney, *Chem. Commun.* **2009**, 3276-3278.
- [57] T. Yamada, C. G. Peng, S. Matsuda, H. Addepalli, K. N. Jayaprakash, M.-R. Alam, *J. Org. Chem.* **2011**, 76, 1198-1211.
- [58] E. Paredes, S. R. Das, *ChemBioChem* **2011**, 12, 125-131.
- [59] P. M. E. Gramlich, S. Warncke, J. Gierlich, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 3442-3444.
- [60] C. L. Droumaguet, C. Wang, Q. Wang, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 1233-1239.
- [61] P. Kele, X. Li, M. Link, K. Nagy, A. Herner, K. Lörincz, S. Beni, O. S. Wolfbeis, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7, 3486-3490.
- [62] F. Seela, V. Sirivolu, P. Chittepu, *Bioconjugate Chem.* **2008**, 19, 211-224.

- [63] F. Seela, H. Xiong, P. Leonard, S. Budow, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7, 1374-1387.
- [64] J. Gierlich, G. A. Burley, P. M. E. Gramlich, D. M. Hammond, T. Carell, *Org. Lett.* **2006**, 8, 3639-3642.
- [65] D. I. Rozkiewicz, J. Gierlich, G. A. Burley, K. Gutsmedl, T. Carell, B. J. Ravoo, D. N. Reinhoudt, *ChemBioChem* **2007**, 9, 1997-2002.
- [66] P. Kocalka, A. H. El-Sagheer, T. Brown, *ChemBioChem* **2008**, 9, 1280-1285.
- [67] R. Kumar, A. El-Sagheer, J. Tumpene, P. Lincoln, L. M. Wilhemsson, T. Brown, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 6859-6864.
- [68] S. S. Pujari, H. Xiong, F. Seela, *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 8693-8696.
- [69] H. Xiong, F. Seela, *J. Org. Chem.* **2011**, 76, 5584-5597.
- [70] J. J. Jewett, C. R. Bertozzi, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 1272-1279.
- [71] T. Ehrenschwender, B. R. Varga, P. Kele, H. A. Wagenknecht, *Chem. Asian J.* **2010**, 5, 1761-1764.
- [72] D. Lachmann, S. Berndt, H. A. Wagenknecht, O. S. Wolfbeis, *Beilstein J. Org. Chem.* **2010**, 6, 1-7.
- [73] S. Berndt, N. Herzig, P. Kele, D. Lachmann, X. Li, O. S. Wolfbeis, H.-A. Wagenknecht, *Bioconjugate Chem.* **2009**, 20, 558-564.
- [74] J. Gierlich, K. Gutsmedl, P. M. E. Gramlich, A. Schmidt, G. A. Burley, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 9486-9494.
- [75] P. M. E. Gramlich, C. T. Wirges, J. Gierlich, T. Carell, *Org. Lett.* **2008**, 10, 249-251.
- [76] D. Baumstark, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 6640-6645.
- [77] G. Scheibe, *Angew. Chem.* **1936**, 49, 563.
- [78] E. E. Jelley, *Nature* **1936**, 138, 1009-1010.
- [79] F. Wurthner, T. E. Kaiser, C. R. Saha-Moller, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 3376-3410.
- [80] E. Mayer-Enthart, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 3372-3375.
- [81] M. Wang, G. L. Silva, B. A. Armitage, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 9977-9986.
- [82] K. C. Hannah, B. A. Armitage, *Acc. Chem. Res.* **2004**, 37, 845-853.

- [83] R. A. Garoff, E. A. Litzinger, R. E. Connor, I. Fishman, B. A. Armitage, *Langmuir* **2002**, *18*, 6330-6337.
- [84] M. Rist, H.-A. Wagenknecht, T. Fiebig, *ChemPhysChem* **2002**, *3*, 704-707.
- [85] R. Varghese, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Commun.* **2009**, 2615-2624.
- [86] M. Kasha, H. R. Rawls, M. A. El-Bayoumi, *Pure Appl. Chem.* **1965**, *11*, 371-392.
- [87] M. Kasha, *Radiation Res.* **1963**, *20*, 55-71.
- [88] A. S. Davydov, *Theory of Molecular Excitons*. Plenum Press: New York, **1971**.
- [89] U. Rösch, S. Yao, R. Wortmann, F. Würthner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7026-7030.
- [90] E. Rabinowitch, L. F. Epstein, *J. Am. Chem. Soc.* **1941**, *63*, 69-78.
- [91] T. Förster, E. König, *Z. Elektrochem.* **1957**, *61*, 344-348.
- [92] R. W. Chambers, T. Kajiwara, D. R. Kearns, *J. Phys. Chem.* **1974**, *78*, 380-387.
- [93] T. Förster, *Naturwissenschaften* **1946**, *33*, 166-175.
- [94] A. Fürstenberg, T. G. Deligeorgiev, N. I. Gadjev, A. A. Vasilev, E. Vauthey, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 8600-8609.
- [95] N. Cooper, N. B. Liebert, *Photogr. Sci. Eng.* **1972**, *16*, 25-34.
- [96] R. W. Chambers, T. Kajiwara, D. R. Kearns, *J. Phys. Chem.* **1974**, *78*, 380-387.
- [97] K. Teuchner, B. Bornowski, W. Becker, S. Dähne, *Z. Chem.* **1976**, *16*, 449-450.
- [98] S. K. Rentsch, D. Fassler, P. Hampe, R. Danielius, R. Gadonas, *Chem. Phys. Lett.* **1982**, *89*, 249-253.
- [99] V. Sundstöm, T. Gillbro, *J. Chem. Phys.* **1985**, *83*, 2733-2743.
- [100] M. Van der Auweraer, B. Verschuere, F. C. D. Schryver, *Langmuir* **1988**, *4*, 583-588.
- [101] K. Saito, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 4235-4238.
- [102] S. Berndl. Fluoreszente H-Aggregate von Thiazol Orange in DNA und RNA, sowie postsynthetische Klick-Ligation an DNA. Dissertation, Universität Regensburg, **2010**.
- [103] A. Okamoto, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5815-5828.

- [104] S. Ikeda, T. Kubota, M. Yuki, A. Okamoto, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6480-6484.
- [105] A. Okamoto, S. Ikeda, *Chem. Asian J.* **2008**, *3*, 958-968.
- [106] S. Ikeda, T. Kubota, K. Kino, A. Okamoto, *Bioconj. Chem.* **2008**, *19*, 1719-1725.
- [107] J. B. Birks, *Nature* **1967**, *214*, 1187-1190.
- [108] F. D. Lewis, Y. Zhang, R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 5451-5452.
- [109] J. Eisinger, M. Guéron, R. G. Shulman, T. Yamane, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1966**, *55*, 1015-1020.
- [110] S. M. Langenegger, R. Häner, *Chem. Commun.* **2004**, 2792-2793.
- [111] K. Yamana, Y. Fukunaga, Y. Ohtani, S. Sato, M. Nakamura, W. J. Kim, T. Akaike, A. Maruyama, *Chem. Commun.* **2005**, 2509-2511.
- [112] F. Seela, S. A. Ingale, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 284-295.
- [113] E. V. Bichenkova, A. R. Sardarian, A. N. Wilton, P. Bonnet, R. A. Bryce, K. T. Douglas, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 367-378.
- [114] Y. Wang, O. Haze, J. P. Dinnocenzo, S. Farid, R. S. Farid, I. R. Gould, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 6970-6981.
- [115] P. Conlon, C. J. Yang, Y. Wu, Y. Chen, K. Martinez, Y. Kim, N. Stevens, A. A. Marti, S. Jockusch, N. J. Turro, W. Tan, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 336-342.
- [116] T. Förster, K. Kasper, *Z. Elektrochem.* **1955**, *59*, 977.
- [117] B. Stevens, M. I. Ban, *Trans. Farraday Soc.* **1964**, *60*, 1515-1523.
- [118] T. Förster, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1969**, *8*, 333-343.
- [119] A. Gilbert, J. Baggot, *Essentials of Molecular Photochemistry*. Blackwell Science Publications: Oxford, **1991**.
- [120] F. Menacher. Perylenbisimidderivate als artifizielle Nukleoside - Darstellung, Untersuchung und Aufbau von DNA Netzwerken. Dissertation, Universität Regensburg, **2011**.
- [121] A. D. Malakhov, M. V. Skorobogaty, I. A. Prokhorenko, S. V. Gontarev, D. T. Kozhich, D. A. Stetsenko, I. A. Stepanova, Z. O. Shenkarev, Y. A. Berlin, V. A. Korshun, *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 1298-1307.

- [122] N. N. Dioubankova, A. D. Malakhov, D. A. Stetsenko, M. J. Gait, P. E. Volynsky, R. G. Efremov, V. A. Korshun, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 841-847.
- [123] K. Yamana, T. Iwai, Y. Ohtani, S. Sato, M. Nakamura, H. Nakano, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 1266-1273.
- [124] N. Bouquin, V. L. Malinovskii, R. Häner, *Chem. Commun.* **2008**, 1974-1976.
- [125] D. Baumstark, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2652-2654.
- [126] Y. N. Teo, J. N. Wilson, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3923-3933.
- [127] Y. N. Teo, E. T. Kool, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 2371-2380.
- [128] Y. N. Teo, J. N. Wilson, E. T. Kool, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 11551-11558.
- [129] J. N. Wilson, Y. N. Teo, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15426-15427.
- [130] N. Dai, Y. N. Teo, E. T. Kool, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 1221-1223.
- [131] S. Leydecker, *Entwicklung der Nanotechnologie, Birkhäuser Basel* **2008**, 20-25.
- [132] H. Goesmann, C. Feldmann, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 1402-1437.
- [133] S. Nayak, L. A. Lyon, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7686-7708.
- [134] I. W. Hamley, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1692-1712.
- [135] K. Riehemann, S. W. Schneider, T. A. Luger, B. Godin, M. Ferrari, H. Fuchs, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 872-897.
- [136] C. A. Mirkin, D. A. Giljohann, D. S. Seferos, W. L. Daniel, M. D. Massich, P. C. Patel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3280-3294.
- [137] V. Sokolova, M. Epple, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1382-1395.
- [138] B. Thiesen, A. Jordan, *Int. J. Hyperthermia* **2008**, *24*, 467-474.
- [139] J. H. Lee, J. T. Jang, J. S. Choi, S. H. Moon, S. H. Noh, J. W. Kim, J. G. Kim, I. S. Kim, K. I. Park, J. Cheon, *Nature Nanotech.* **2011**, *6*, 418-422.
- [140] S. Heer, K. Kömpe, M. Haase, H. U. Güdel, *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 2102-2105.
- [141] F. Wang, X. Liu, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 976-989.
- [142] F. Auzel, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 139-173.
- [143] M. Haase, H. Schäfer, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 5928-5950.
- [144] O. S. Wolfbeis, H. S. Mader, P. Kele, S. M. Saleh, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 582-596.

- [145] H. Mader. Surface Modification of Silica Particles and Upconverting Particles Using Click Chemistry. Dissertation, Universität Regensburg, **2010**.
- [146] F. Wang, J. A. Wang, X. G. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 7456-7460.
- [147] F. Wang, D. Banerjee, Y. S. Liu, X. Y. Chen, X. G. Liu, *Analyst* **2010**, *135*, 1839-1854.
- [148] T. Soukka, T. Rantanen, K. Kuningas, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2008**, *1130*, 188-200.
- [149] S. L. He, Q. Q. Zhan, J. Qian, H. J. Liang, G. Somesfalean, D. Wang, Z. G. Zhang, S. Andersson-Engels, *ACS Nano* **2011**, *5*, 3744-3757.
- [150] Y. Zhang, D. K. Chatterjee, M. K. Gnanasammandhan, *Small* **2010**, *6*, 2781-2795.
- [151] J. C. Boyer, F. C. J. M. van Veggel, *Nanoscale* **2010**, *2*, 1417-1419.
- [152] S. Jiang, Y. Zhang, K. M. Lim, E. K. W. Sim, L. Ye, *Nanotechnol.* **2009**, *20*, 155101.
- [153] F. v. d. Rijke, H. Zijlmans, S. Li, T. Vail, A. K. Raap, R. S. Niedbala, H. J. Tanke, *Nature Biotechnol.* **2001**, *19*, 273-276.
- [154] P. Zhang, M. Kumar, Y. Guo, *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 1522-1526.
- [155] P. Zhang, S. Rogelj, K. Nguyen, D. Wheeler, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12410-12411.
- [156] L. H. Fischer, G. S. Harms, O. S. Wolfbeis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 4546-4551.
- [157] S. H. Nam, Y. M. Bae, Y. Il Park, J. H. Kim, H. M. Kim, J. S. Choi, K. T. Lee, T. Hyeon, Y. D. Suh, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 6093-6097.
- [158] S. F. Lim, R. Riehn, W. S. Ryu, N. Khanarian, C. K. Tung, D. Tank, R. H. Austin, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 169-174.
- [159] D. K. Chatterjee, A. J. Ruffah, Y. Zhang, *Biomaterials* **2008**, *29*, 937-943.
- [160] C. H. Liu, Z. Wang, H. X. Jia, Z. P. Li, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 4661-4663.
- [161] H. C. Guo, N. M. Idris, Y. Zhang, *Langmuir* **2011**, *27*, 2854-2860.
- [162] H. Wang, R. H. Yang, L. Yang, W. H. Tan, *ACS Nano* **2009**, *3*, 2451-2460.
- [163] C. M. Niemeyer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4128-4158.
- [164] I. Willner, E. Katz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6042-6108.
- [165] S. Meng, P. Maragakis, C. Papaloukas, E. Kaxiras, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 45-50.

- [166] Y. R. Wu, J. A. Phillips, H. P. Liu, R. H. Yang, W. H. Tan, *ACS Nano* **2008**, 2, 2023-2028.
- [167] R. H. Yang, Z. W. Tang, J. L. Yan, H. Z. Kang, Y. M. Kim, Z. Zhu, W. H. Tan, *Anal. Chem.* **2008**, 80, 7408-7413.
- [168] M. Kumar, Y. Guo, P. Zhang, *Biosens. Bioelectron.* **2009**, 24, 1522-1526.
- [169] M. Kumar, P. Zhang, *Langmuir* **2009**, 25, 6024-6027.
- [170] M. Yliharsila, T. Valta, M. Karp, L. Hattara, E. Harju, J. Holsa, P. Saviranta, M. Waris, T. Soukka, *Anal. Chem.* **2011**, 83, 1456-1461.
- [171] J. I. Cutler, D. Zheng, X. Xu, D. A. Giljohann, C. A. Mirkin, *Nano Lett.* **2010**, 10, 1477-1480.
- [172] A. E. Rowan, M. Brust, *et al.*, *Bioconj. Chem.* **2006**, 17, 1373-1375.
- [173] C. E. Chen, J. Geng, F. Pu, X. J. Yang, J. S. Ren, X. G. Qu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 882-886.
- [174] S. A. Krovi, D. Smith, S. T. Nguyen, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 5277-5279.
- [175] C. E. Evans, P. A. Lovell, *Chem. Commun.* **2009**, 2305-2307.
- [176] N. Boening, C. Niemann, *Greenpeace Magazin* **2008**, (2).
- [177] H. Schmundt, M. Verbeet, *Der Spiegel* **2008**, 24, 148-150.
- [178] M. Bauchmüller, K. Blawat, *Sueddeutsche Zeitung* **2011**, SZ vom 01.09.2011.
- [179] N. Lewinski, V. Colvin, R. Drezek, *Small* **2008**, 4, 26-49.
- [180] F. Zhao, Y. Zhao, Y. Liu, X. L. Chang, C. Y. Chen, Y. L. Zhao, *Small* **2011**, 7, 1322-1337.
- [181] C. M. Goodman, C. D. McCusker, T. Yilmaz, V. M. Rotello, *Bioconj. Chem.* **2004**, 15, 897-900.
- [182] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2004-2021.
- [183] P. Kele, G. Mezö, D. Achatz, O. S. Wolfbeis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 344-347.
- [184] M. Grotli, M. Douglas, R. Eritja, B. S. Sproat, *Tetrahedron* **1998**, 54, 5899-5914.
- [185] D. L. Hughes, *Org. React.* **1992**, 42, 335-656.
- [186] B. Lal, B. N. Pramanik, M. S. Manhas, A. K. Bose, *Tetrahedron Lett.* **1977**, 23, 1977-1980.

- [187] M. Grotli, M. Douglas, B. Beijer, R. Gümil, G. R. Eritja, B. Sproat, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1997**, 2779-2789.
- [188] B. Beijer, M. Grotli, M. E. Douglas, B. S. Sproat, *Nucleosides & Nucleotides* **1994**, 13, 1905-1927.
- [189] C. Prunkl. Untersuchung der Fluoreszenz- und Elektronentransfereigenschaften von Phenanthridinium- Derivaten in DNA. Dissertation, Universität Regensburg, **2009**.
- [190] B. Nowakowska, K. Adrych, W. T. Markiewicz, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 1561-1564.
- [191] R. L. Letsinger, V. Mahadevan, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 87, 3526-3527.
- [192] M. H. Caruthers, *et al.*, *Meth. Enzymol.* **1987**, 154, 287-313.
- [193] S. Thyagarajan, N. N. Murthy, A. A. N. Sarjeant, K. D. Karlin, S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 7003-7008.
- [194] C. J. Burrows, J. G. Muller, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1109-1151.
- [195] G. Park, J. T. Tomlinson, M. S. Melvin, M. W. Wright, C. S. Day, R. A. Manderville, *Org. Lett.* **2003**, 5, 113-116.
- [196] T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Org. Lett.* **2004**, 6, 2853-2855.
- [197] C. Prunkl, S. Berndl, C. Wanninger-Weiß, J. Barbaric, H.-A. Wagenknecht, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, 12, 32-43.
- [198] C. Prunkl, M. Pichlmaier, R. Winter, V. Kharlanov, W. Rettig, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2010**, 16, 2293-3402.
- [199] C. Wagner, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6, 48-50.
- [200] D. Fukumura, D. E. J. G. J. Dolmans, R. K. Jain, *Nature Rev. Cancer* **2003**, 3, 380-387.
- [201] M. R. Hamblin, A. P. Castano, P. Mroz, *Nature Rev. Cancer* **2006**, 6, 535-545.
- [202] T. Biver, A. Boggioni, F. Secco, E. Turriani, M. Venturini, S. Yarmoluk, *Arch. Biochem. Biophys.* **2007**, 465, 90-100.
- [203] V. A. Svetlichnyi, A. A. Ishchenko, E. A. Vaitulevich, N. A. Derevyanko, A. V. Kulinich, *Optics Commun.* **2008**, 281, 6072-6079.
- [204] W. West, S. Pearce, *J. Phys. Chem.* **1965**, 69, 1894-1903.
- [205] J. Nygren, N. Svanvik, M. Kubista, *Biopolymers* **1998**, 46, 39-51.

- [206] G. L. Silva, V. Ediz, D. Yaron, B. A. Armitage, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5710-5718.
- [207] W. West, S. Pearce, F. Grum, *J. Phys. Chem.* **1967**, *71*, 1316-1326.
- [208] J. Widengren, P. Schwille, *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104*, 6416-6428.
- [209] I. Baraldi, A. Carnevali, F. Momicchioli, G. Ponterini, *Spectrochim. Acta Part A* **1993**, *49*, 471-495.
- [210] M. E. Sanborn, B. K. Connolly, K. Gurunathan, M. Levitus, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 11064-11074.
- [211] V. Karunakaran, J. L. P. Lustres, L. Zhao, N. P. Ernsting, O. Seitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2954-2962.
- [212] S. M. Yarmulok, S. S. Lukashov, T. Y. Ogul'chansky, M. Y. Losytskyy, O. S. Korniyushyna, *Biopolymers* **2001**, *62*, 219-227.
- [213] D. B. Hall, R. E. Holmlin, J. K. Barton, *Nature* **1996**, *382*, 731-735.
- [214] F. Seela, H. Li, X. H. Peng, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 6031-6034.
- [215] M. Torimura, S. Kurata, K. Yamada, T. Yokomaku, Y. Kamagata, T. Kanagawa, R. Kurane, *Anal. Sci.* **2001**, *17*, 155-160.
- [216] V. V. Pavlishchuk, A. W. Addison, *Inorg. Chim. Acta* **2000**, *298*, 97-102.
- [217] A. Weller, *Z. Phys. Chem.* **1982**, *133*, 93-98.
- [218] D. H. Waldeck, K. Kumar, I. V. Kurnikov, D. N. Beratan, M. B. Zimmt, *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 5529-5541.
- [219] C. A. M. Seidel, A. Schulz, M. H. M. Sauer, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 5541-5553.
- [220] M. P. Scannell, D. J. Fenick, S.-R. Yeh, D. E. Falvey, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1971-1977.
- [221] M. A. Firer, R. Laptev, M. Nisnevitch, G. Siboni, Z. Malik, *British J. Cancer* **2006**, *95*, 189-196.
- [222] S. Steenken, S. V. Jovanovic, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 617-618.
- [223] C. A. M. Seidel, A. Schulz, M. H. M. Sauer, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 5541-5553.
- [224] R. Yuste, *Nature Meth.* **2005**, *2*, 902-904.
- [225] I. Johnson, *Histochem. J.* **1998**, *30*, 123-140.
- [226] J. Zhang, R. E. Campbell, A. Y. Ting, R. Y. Tsien, *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* **2002**, *3*, 906-918.

- [227] S. Yang, H. Tian, H. Xiao, X. Shang, X. Gong, S. Yao, K. Chen, *Dyes Pigments* **2001**, 49, 93-101.
- [228] P. Chen, S. Q. Sun, Y. F. Hu, Z. G. Qian, D. S. Zheng, *Dyes Pigments* **1999**, 41, 227-231.
- [229] C. Kanony, B. Akerman, E. Tuite, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 7985-7995.
- [230] K. Kino, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 7373-7374.
- [231] Y. T. Chang, A. Samanta, M. Vendrell, R. Das, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 7406-7408.
- [232] P. Chen, J. Li, Z. G. Qian, D. S. Zheng, T. Okasaki, M. Hayami, *Dyes Pigments* **1998**, 37, 213-222.
- [233] A. A. Frimer, *Chem. Rev.* **1979**, 79, 359-387.
- [234] C. S. Foote, *Science* **1968**, 162, 963-970.
- [235] A. Toutchkine, D. V. Nguyen, K. M. Hahn, *Org. Lett.* **2007**, 9, 2775-2777.
- [236] H. Koshinsky, M. Wang, R. Holmes-Davis, Z. Rafinski, B. Jedrzejewska, K. Y. Choi, M. Zwick, C. Bupp, A. Izmailov, J. Paczkowski, B. Warner, *Anal. Chem.* **2009**, 81, 2043-2052.
- [237] C. P. Chen, B. M. Zhou, D. H. Li, G. G. Xu, *J. Photochem. Photobiol. A* **1995**, 89, 25-29.
- [238] M. Henary, M. Mojzych, *Top. Heterocycl. Chem.* **2008**, 14, 221-238.
- [239] M. Cigan, A. Gaplovsky, I. Sigmundova, P. Zahradnik, R. Dedic, M. Hromadova, *J. Phys. Org. Chem.* **2011**, 24, 450-459.
- [240] A. A. Gorman, M. A. J. Rodgers, *Chem. Soc. Rev.* **1981**, 10, 205-231.
- [241] A. K. Chibisov, G. V. Zakharova, H. Gorner, *J. Chem. Soc. Faraday Transact.* **1996**, 92, 4917-4925.
- [242] G. Heilig, W. Lüttke, *Chem. Ber.* **1988**, 121, 407-410.
- [243] R. Guether, M. V. Reddington, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 6167-6170.
- [244] B. A. Armitage, B. R. Renikuntla, H. C. Rose, J. Eldo, A. S. Waggoner, *Org. Lett.* **2004**, 6, 909-912.
- [245] N. I. Shank, K. J. Zanotti, F. Lanni, P. B. Berget, B. A. Armitage, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 12960-12969.
- [246] P. F. Conn, W. Schalch, T. G. Truscott, *J. Photochem. Photobiol. B* **1991**, 11, 41-47.

- [247] A. S. Tatikolov, K. S. Dzhulibekov, L. A. Shvedova, V. A. Kuzmin, A. A. Ishchenko, *J. Phys. Chem.* **1995**, 99, 6525-6529.
- [248] H. Mustroph, C. Weiss, *J. Prakt. Chem.* **1986**, 328, 937-940.
- [249] I. Murkovic, A. Lobnik, G. J. Mohr, O. S. Wolfbeis, *Anal. Chim. Acta* **1996**, 334, 125-132.
- [250] B. Kopainsky, P. Qiu, W. Kaiser, B. Sens, K. H. Drexhage, *Appl. Phys. B* **1982**, 29, 15-18.
- [251] A. V. Kulinich, N. A. Derevyanko, A. A. Ishchenko, S. L. Bondarev, V. N. Knyukshto, *J. Photochem. Photobiol. A* **2008**, 200, 106-113.
- [252] T. L. Netzel, K. Nafisi, M. Zhao, J. R. Lenhard, I. Johnson, *J. Phys. Chem.* **1995**, 99, 17936-17947.
- [253] M. E. Nunez, K. T. Noyes, D. A. Gianolio, L. W. McLaughlin, J. K. Barton, *Biochemistry* **2000**, 39, 6190-6199.
- [254] W. Tan, K. Wang, T. J. Drake, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, 8, 547-553.
- [255] W. H. Tan, Y. Kim, D. Sohn, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2008**, 1, 105-116.
- [256] S. Tyagi, F. R. Kramer, *Nature Biotechnol.* **1996**, 14, 303-308.
- [257] N. E. Broude, *Trends Biotech.* **2002**, 20, 249-256.
- [258] K. Wang, Z. Tang, C. J. Yang, Y. Kim, X. Fang, W. Li, Y. Wu, C. D. Medley, Z. Cao, J. Li, P. Colon, H. Lin, W. Tan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 856-870.
- [259] S. S.-M. Sum, D. K.-H. Wong, M.-F. Yuen, H.-J. Yuan, J. Yu, C.-L. Lai, D. Ho, L. Zhang, *J. Clin. Microbiol.* **2004**, 42, 3438-3440.
- [260] J. R. Epstein, I. Biran, D. R. Walt, *Anal. Chim. Acta* **2002**, 469, 3-36.
- [261] T. Vo-Dinh, M. Culha, D. L. Stokes, G. D. Griffin, *Biosens. Bioelectron.* **2004**, 19, 1007-1012.
- [262] E. T. Kool, A. P. Silverman, *Trends Biotech.* **2005**, 23, 225-230.
- [263] S. Tyagi, D. P. Bratu, F. R. Kramer, *Nature Biotechnol.* **1998**, 16, 49-53.
- [264] W. J. Harrison, D. L. Mateer, G. J. T. Tiddy, *J. Phys. Chem.* **1996**, 100, 2310-2321.
- [265] T. Sagawa, H. Tobata, H. Ihara, *Chem. Commun.* **2004**, 2090-2091.
- [266] C. Holzhauser, S. Berndl, F. Menacher, M. Breunig, A. Göpferich, H.-A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 1239-1248.
- [267] T. Förster, *Ann. Physik* **1948**, 437, 55-75.

- [268] K. E. Sapsford, L. Berti, I. L. Medintz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4562-4588.
- [269] M. K. Johansson, H. Fidder, D. Dick, R. M. Cook, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6950-6956.
- [270] A. Okamoto, T. Ichiba, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8364-8365.
- [271] S. Ikeda, H. Yanagisawa, A. Nakamura, D. O. Wang, M. Yuki, A. Okamoto, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 4199-4204.
- [272] T. Kubota, S. Ikeda, H. Yanagisawa, M. Yuki, A. Okamoto, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 1625-1630.
- [273] T. Kubota, S. Ikeda, H. Yanagisawa, M. Yuki, A. Okamoto, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 1256-1261.
- [274] H. Asanuma, K. Shirasuka, T. Takarada, H. Kashida, M. Komiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2217-2223.
- [275] F. D. Lewis, L. Zhang, X. Liu, X. Zuo, D. M. Tiede, H. Long, G. C. Schatz, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14445-14453.
- [276] A. Larsson, C. Carlsson, M. Jonsson, B. Albinsson, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 8459-8465.
- [277] *Nat. Genet.* **2010**, *42*, 441-447.
- [278] J. R. Kelsoe, *Nature* **2010**, *468*, 1049-1050.
- [279] D. Goldman, L. Bevilacqua, *et al.*, *Nature* **2010**, *468*, 1061-U460.
- [280] A. P. Lam, D. A. Dean, *Gene Therapy* **2010**, *17*, 439-447.
- [281] L. K. Medina-Kauwe, J. Xie, S. Hamm-Alvarez, *Gene Therapy* **2005**, *12*, 1734-1751.
- [282] S. Akhtar, R. L. Juliano, *Trends Cell Biol.* **1992**, *2*, 139-144.
- [283] M. A. E. M. van der Aa, U. S. Huth, S. Y. Hafele, R. Schubert, R. S. Oosting, E. Mastrobattista, W. E. Hennink, R. Peschka-Suss, G. A. Koning, D. J. A. Crommelin, *Pharm. Res.* **2007**, *24*, 1590-1598.
- [284] R. Kircheis, S. Schuller, S. Brunner, M. Ogris, K. H. Heider, W. Zauner, E. Wagner, *J. Gene Med.* **1999**, *1*, 111-120.
- [285] M. Thomas, A. M. Klibanov, *Appl. Microbiol. Biotech.* **2003**, *62*, 27-34.
- [286] Yong Woo Cho, Jong-Duk Kim, K. Park, *J. Pharm. Pharmacol.* **2003**, *55*, 721-734.
- [287] J. H. Sandell, R. H. Masland, *J. Histochem. Cytochem.* **1988**, *36*, 555-559.

- [288] J. Lübke, *Microsc. Res. Techniq.* **1993**, 24, 2-14.
- [289] M. Bentivoglio, H. S. Su, *Neurosc. Lett.* **1990**, 113, 127-133.
- [290] X. K. Shu, V. Lev-Ram, T. J. Deerinck, Y. C. Qi, E. B. Ramko, M. W. Davidson, Y. S. Jin, M. H. Ellisman, R. Y. Tsien, *Plos Biol.* **2011**, 9, e1001041.
- [291] J. E. Natera, W. A. Massad, F. Amat-Guerri, N. A. Garcia, *J. Photochem. Photobiol. A* **2011**, 220, 25-30.
- [292] A. R. Maranto, *Science* **1982**, 217, 953-955.
- [293] C. Meisslitzer-Ruppitsch, M. Vetterlein, H. Stangl, S. Maier, J. Neumuller, M. Freissmuth, M. Pavelka, A. Ellinger, *Histochem. Cell Biol.* **2008**, 130, 407-419.
- [294] T. J. Deerinck, M. E. Martone, V. Levram, D. P. L. Green, R. Y. Tsien, D. L. Spector, S. Huang, M. H. Ellisman, *J. Cell Biol.* **1994**, 126, 901-910.
- [295] C. Meisslitzer-Ruppitsch, C. Röhrli, J. Neumüller, M. Pavelka, A. Ellinger, *J. Microsc.* **2009**, 235, 322-335.
- [296] H. S. Mader, P. Kele, S. M. Saleh, O. S. Wolfbeis, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, 14, 582-596.
- [297] C. T. Xu, N. Svensson, J. Axelsson, P. Svenmarker, G. Somesfalean, G. Y. Chen, H. J. Liang, H. C. Liu, Z. G. Zhang, S. Andersson-Engels, *Appl. Phys. Lett.* **2008**, 93, 171103.
- [298] R. H. Yang, H. Wang, L. Yang, W. H. Tan, *ACS Nano* **2009**, 3, 2451-2460.
- [299] A. Verma, F. Stellacci, *Small* **2010**, 6, 12-21.
- [300] D. W. Wright, A. Jayagopal, K. C. Halfpenny, J. W. Perez, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 9789-9796.
- [301] C. A. Mirkin, N. L. Rosi, D. A. Giljohann, C. S. Thaxton, A. K. R. Lytton-Jean, M. S. Han, *Science* **2006**, 312, 1027-1030.
- [302] D. E. Achatz, R. Ali, O. S. Wolfbeis, *Top. Curr. Chem.* **2011**, 300, 29-50.
- [303] H. S. Mader, M. Link, D. E. Achatz, K. Uhlmann, X. Li, O. S. Wolfbeis, *Chem. Eur. J.* **2010**, 16, 5416-5424.
- [304] X. S. Zhao, C. L. Chen, W. J. Wang, J. Ge, *Nucl. Acids Res.* **2009**, 37, 3756-3765.
- [305] C. A. Mirkin, R. C. Jin, G. S. Wu, Z. Li, G. C. Schatz, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 1643-1654.
- [306] J. B. Lepecq, C. Paoletti, *J. Mol. Biol.* **1967**, 27, 87-106.
- [307] C. Aaij, P. Borst, *Biochim. Biophys. Acta* **1972**, 269, 192-200.

- [308] C. A. Mirkin, N. L. Rosi, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1547-1562.
- [309] C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic, J. J. Storhoff, *Nature* **1996**, *382*, 607-609.
- [310] M. De, P. S. Ghosh, V. M. Rotello, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 4225-4241.
- [311] C. A. Mirkin, R. A. Reynolds, R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3795-3796.
- [312] C. A. Mirkin, X. Y. Xu, M. S. Han, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3468-3470.
- [313] X. D. Su, Y. N. Tan, Y. Zhu, J. Y. Lee, *ACS Nano* **2010**, *4*, 5101-5110.
- [314] O. Gang, D. Nykypanchuk, M. M. Maye, D. van der Lelie, *Nature* **2008**, *451*, 549-552.
- [315] M. Brust, A. G. Kanaras, Z. X. Wang, A. D. Bates, R. Cosstick, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 191-194.
- [316] C. Chi, M. M. Maye, A. L. Stadler, D. van der Lelie, O. Gang, *Adv. Funct. Mater.* **2011**, *21*, 1051-1057.
- [317] L. H. Wang, F. Li, J. Zhang, X. N. Cao, D. Li, S. P. Song, B. C. Ye, C. H. Fan, *Analyst* **2009**, *134*, 1355-1360.
- [318] C. M. Niemeyer, B. Ceyhan, P. Hazarika, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5766-5770.
- [319] C. M. Niemeyer, B. Ceyhan, M. Noyong, U. Simon, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *311*, 995-999.
- [320] Y. Lu, J. W. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 90-94.
- [321] J. F. Lovell, H. Jin, K. K. Ng, G. Zheng, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 7917-7919.
- [322] C. A. Mirkin, G. P. Mitchell, R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8122-8123.
- [323] C. A. Mirkin, F. W. Huo, A. K. R. Lytton-Jean, *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 2304-2306.
- [324] L. Wang, Y. Li, *Chem. Commun.* **2006**, 2557-2559.
- [325] E. Boisselier, D. Astruc, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 1759-1782.
- [326] C. M. Niemeyer, B. Zou, B. Ceyhan, U. Simon, *Adv. Mat.* **2005**, *17*, 1643-1647.
- [327] C. M. Niemeyer, P. Hazarika, B. Ceyhan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6469-6471.

- [328] C. M. Niemeyer, B. Ceyhan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3685-3688.
- [329] C. M. Niemeyer, B. Ceyhan, S. Gao, L. Chi, S. Peschel, U. Simon, *Coll. Polym. Science* **2001**, *279*, 68-72.
- [330] O. Gang, M. M. Maye, D. Nykypanchuk, D. van der Lelie, *Small* **2007**, *3*, 1678-1682.
- [331] X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir, S. Weiss, *Science* **2005**, *307*, 538-544.
- [332] D. A. Giljohann, D. S. Seferos, P. C. Patel, J. E. Millstone, N. L. Rosi, C. A. Mirkin, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 3818-3821.
- [333] J. Dausend, A. Musyanovych, M. Dass, P. Walther, H. Schrezenmeier, K. Landfester, V. Mailander, *Macromol. Biosci.* **2008**, *8*, 1135-1143.
- [334] C. Brandenberger, C. Muhlfeld, Z. Ali, A. G. Lenz, O. Schmid, W. J. Parak, P. Gehr, B. Rothen-Rutishauser, *Small* **2010**, *6*, 1669-1678.
- [335] S. A. Hilderbrand, F. W. Shao, C. Salthouse, U. Mahmood, R. Weissleder, *Chem. Commun.* **2009**, 4188-4190.
- [336] F. Wang, D. K. Chatterjee, Z. Q. Li, Y. Zhang, X. P. Fan, M. Q. Wang, *Nanotechnology* **2006**, *17*, 5786-5791.
- [337] L. Q. Xiong, Z. G. Chen, M. X. Yu, F. Y. Li, C. Liu, C. H. Huang, *Biomaterials* **2009**, *30*, 5592-5600.
- [338] J. Zhou, Y. Sun, X. X. Du, L. Q. Xiong, H. Hu, F. Y. Li, *Biomaterials* **2010**, *31*, 3287-3295.
- [339] H. Hu, L. Q. Xiong, J. Zhou, F. Y. Li, T. Y. Cao, C. H. Huang, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 3577-3584.
- [340] R. A. Jalil, Y. Zhang, *Biomaterials* **2008**, *29*, 4122-4128.
- [341] G. K. Das, P. P. Y. Chan, A. Teo, J. S. C. Loo, J. M. Anderson, T. T. Y. Tan, *J. Biomed. Mater. Res. A* **2009**, *93*, 337-346.
- [342] A. Petushkov, J. Intra, J. B. Graham, S. C. Larsen, A. K. Salem, *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22*, 1359-1368.
- [343] L. Moller, H. L. Karlsson, P. Cronholm, J. Gustafsson, *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 1726-1732.
- [344] E. Primiceri, M. S. Chiriaco, E. D'Amone, E. Urso, R. E. Ionescu, A. Rizzello, M. Maffia, R. Cingolani, R. Rinaldi, G. Maruccio, *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 2711-2716.

- [345] M. Heinlaan, A. Ivask, I. Blinova, H. C. Dubourguier, A. Kahru, *Chemosphere* **2008**, 71, 1308-1316.
- [346] W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.* **1978**, 43, 2923–2925.
- [347] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 7512-7515.
- [348] J. H. Murphy, T. L. Trapane, *Anal. Biochem.* **1996**, 273-282.
- [349] C. R. Cantor, M. M. Warshaw, H. Shapiro, *Biopolymers* **1970**, 9, 1059-1077.
- [350] J. N. Demas, G. A. Crosby, *J. Phys. Chem.* **1971**, 75, 991-1024.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Regensburg den 24. November 2011

Moritz M. Rubner